

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Lucie Novotná

Role mikroorganismů v evoluci reprodukčních strategií ptáků

Role of microorganisms in the evolution of reproductive strategies in birds

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Veronika Javůrková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jakub Kreisinger, Ph.D.

Praha, 2013

Poděkování:

Ráda bych poděkovala zejména své školitelce Veronice Javůrkové a svému konzultantovi Jakubu Kreisingerovi za vstřícnost, trpělivost a cenné rady a dále všem, kteří mě během psaní podporovali.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.5.2013

Podpis

Abstrakt

Mikroorganismy jsou všudypřítomné, nalézají se v hnízdech, na těle ptáků nebo se do hnízda dostávají společně s hnízdním materiálem. Vejce nakladená do hnízd tak mohou být mikroorganismy kolonizovány na povrchu skořápky nebo mohou za určitých podmínek pronikat do vnitřních struktur vejce. Tato mikrobiální infekce uvnitř vejce může ovlivňovat především jeho líhnivost, způsobovat mortalitu embrya nebo následně ovlivnit fenotyp mláděte. Nicméně, pravděpodobnost bakteriálního zatížení na skořápce či infekce vnitřních struktur vejce závisí také na podmínkách prostředí, typu hnízda, inkubačním chování a použitém hnízdním materiálu. Mimo to, některé modifikace v reprodukčních strategiích ptáků vedou k výraznému potlačení negativního vlivu mikrobiální infekce a následnému zlepšení reprodukčního úspěchu ptáků. Mezi tyto obranné mechanismy patří především inkubace, mechanické a chemické bariéry samotného vejce, pigmentace vejce nebo zabudování zelených rostlin a perí do hnízdní výstelky. Na základě těchto poznatků lze usuzovat, že rozdílné reprodukční strategie ptáků mohly velmi pravděpodobně vzniknout také selekčním tlakem ze strany mikroorganismů. Přestože tento předpoklad vlivu mikroorganismů na evoluci rozdílných reprodukčních strategií ptáků má v současnosti velmi silnou podporu, výzkum této problematiky se stále potýká s především metodickými nedostatky, které je nutné v budoucích studiích eliminovat.

Abstract

Microorganisms are ubiquitous and can be found on the body of birds, in avian nests or may be carried into the nest along with nest-lining material. Microorganisms may therefore colonize eggshells of eggs in a clutch and subsequently penetrate into the egg contents. This so called trans-shell infection has been observed to affect hatching success, cause embryo mortality or subsequently influence hatchlings phenotype. Nevertheless, the probability of eggshell bacterial load or trans-shell infection depends on many factors, including environmental conditions, nest type, incubation pattern, and nest-lining material. Furthermore, some modifications of avian reproductive strategies may lead to reduction of negative effect of trans-shell infections, and significantly improve reproductive success. These mechanisms include incubation, mechanical and chemical barriers of egg, eggshell pigments or using of feathers and specific plants as nest lining material. Based on these findings, it can be concluded that the different reproductive strategies in birds should be a result of strong selective pressure caused by microorganisms. Although many recent studies have supported this assumption, research on this issue still suffers from many methodological shortcomings that must be eliminated in future studies.

Klíčová slova: infekce vejce, mikroorganismy, líhnivost, mortalita embrya, hnízdní materiál, inkubační chování, antimikrobiální proteiny, pigmentace vejce

Key words: Trans-shell infection, microorganisms, hatchability, embryo mortality, nest material, incubation behaviour, antimicrobial proteins, eggshell pigmentation

Obsah

1. Úvod	5
2. Mechanismy výskytu mikroorganismů na povrchu a ve vnitřních strukturách vejce – horizontální vs. vertikální přenos.....	6
3. Zdroje a typy mikroorganismů v hnízdním prostředí	7
4. Efekt přítomnosti mikroorganismů na povrchu a ve vnitřních strukturách vejce.....	8
5. Faktory ovlivňující přítomnost mikroorganismů na povrchu a uvnitř vejce	11
5.1 Hnízdní mikroklima	11
5.2 Zeměpisné šířka (tropický vs. mírný pás)	12
5.3 Typ hnízda a hnízdního materiálu	13
6. Obranné mechanismy redukující přítomnost mikroorganismů na povrchu a uvnitř vejce.....	15
6.1 Inkubace	15
6.2 Mechanické a chemické bariéry vejce.....	18
6.2.1 Kutikula.....	18
6.2.2 Pigmentace vaječné skořápky.....	18
6.2.3 Antimikrobiální proteiny bílku	20
6.3 Zabudovávání zelených rostlin do hnízda a hnízdní výstelky	22
7. Potenciální evoluční důsledky vlivu mikroorganismů na reprodukční strategie ptáků	24
7.1 Inkubační „pattern“ a synchronní vs. asynchronní líhnutí	24
7.2 Velikost snůšky ptáků hnízdících v tropickém vs. mírném podnebném pásu.....	25
7.3 Pigmentace vajec druhů s rozdílnými hnízdními strategiemi.....	25
8. Metodické nedostatky studií zabývajících se vztahem mikroorganismů a reprodukčních strategií ptáků	26
8.1 Metody používané pro determinaci mikroorganismů a jejich negativní důsledky na interpretační úroveň současných studií.....	26
8.2 Opomíjení významu mikroskopických hub.....	27
9. Závěr.....	29
10. Přehled použité literatury	31
11. Přílohy	38

1. Úvod

Podmínky hnízdního habitatu jsou bezpochyby považovány za jedny z hlavních selekčních faktorů, působících různou měrou na reprodukční úspěch ptáků. Zatímco faktorům jako je teplota, humidita, predací tlak a celé řadě dalších mikrohabitatových charakteristik schopných ovlivňovat reprodukční úspěch ptáků byla doposud v literatuře věnována velká pozornost (viz např. Arnold 1987; Verbeek 1988) význam mikroorganismů jako nedílné součásti hnízdního prostředí a jejich vlivu na reprodukční úspěch ptáků byl doposud přehlížen.

Mikroorganismy mohou interagovat s ptačími hostiteli různými způsoby. Komensální bakterie žijí v peří ptáků nebo jsou součástí střevní mikroflóry. Některé mohou díky produkci antimikrobiálních látek kompetovat s bakteriemi pro svého hostitele patogenními a stávat se tak mutualisty. Naopak, negativní vliv na hostitelovu fitness mají bakterie, které jsou obligátními či oportunními patogeny. Již předešlé studie věnované komerčně chovaným druhům ptáků (McCabe 1964; Bruce & Johnson 1978; Board *et al.* 1979; Clay & Board 1991), stejně tak experimentální studie z posledních let (Cook *et al.* 2003, 2005b; Godard *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011; Javůrková *et al.* 2013 in press) naznačují, že mikroorganismy přítomné v hnízdním prostředí mohou zásadně ovlivňovat životaschopnost embrya a tím např. líhivost vajec (Baggott & Greame-Cook 2002). Bez studia mikroorganismů jako selekčního agens v reprodukční biologii ptáků tedy nelze zcela pochopit rozdílné reprodukční strategie ptáků a jejich evoluční význam.

Cílem této literární rešerše by mělo být shrnutí dosavadních poznatků o mikroorganismech v hnízdním prostředí a jejich vlivu na reprodukční úspěch ptáků. Mimo jiné bude poukázáno na zdroje mikroorganismů v hnízdě, podmínky zvyšující pravděpodobnost výskytu bakterií na povrchu vejce a jejich průniku do vnitřních struktur vejce. Dále budou shrnuty mechanismy eliminující toto riziko mikrobiální infekce. Na základě získaných informací bude rovněž poukázáno na možné evoluční důsledky způsobené selekčním tlakem ze strany mikroorganismů na ptačího hostitele. V závěru práce pak budou zhodnoceny některé nedostatky současných studií a navrženy možné směry dalšího výzkumu týkajícího se této problematiky.

2. Mechanismy výskytu mikroorganismů na povrchu a ve vnitřních strukturách vejce – horizontální vs. vertikální přenos

Předpoklad všudypřítomného výskytu mikroorganismů určuje, že jak samotný jedinec, tak jeho snůška může být různou měrou mikroorganismy kolonizována. Nejčastěji se mikroorganismy nacházejí v hnízdě, odkud pak kolonizují povrch vejce. Zde by jejich výskyt logicky nemusel znamenat hrozbu, nicméně bylo prokázáno, že může docházet k tzv. horizontálnímu přenosu mikrobiální infekce, kdy mikroorganismy na povrchu vejce mohou pronikat skrz skořápku a infikovat tak vyvíjející se embryo (McCabe 1964; Board & Tranter 1986; Cook *et al.* 2003, 2005b; Fonseca *et al.* 2011). Mikroorganismy pronikají do vajíčka skrz vaječné póry (Board 1966; Board & Tranter 1986). K významné penetraci mikroorganismů skrz skořápku může docházet ihned po nakladení vajec do snůšky (Board & Tranter 1986; Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011), kdy rozdíl teplot v kloace a vnějším prostředí způsobí kontrakci žloutku a bílku, která umožní nasátí mikroorganismů společně s vodou na povrchu skořápky skrz póry (Zagaevsky & Lutikova 1944, podle Board 1966). Infekce se pak dál může šířit přes vaječnou membránu do bílku a žloutku (Board 1966; Board & Tranter 1986).

Mezi další způsoby kontaminace vajec bakteriemi patří vertikální přenos. K vertikálnímu přenosu dochází, když jsou vejce infikována během formování v reprodukčních orgánech samice (Gantois *et al.* 2009) a při ovipozici, kdy vejce prochází kloakou (Bruce & Drysdale 1994). Ke kontaminaci žloutku nejčastěji dochází při bakteriální infekci vaječníku. V závislosti na místě infekce či kolonizace bakteriemi může docházet ke kontaminaci vaječného obsahu také na různých místech ve vejcovodu. Ten je totiž rozdělen do několika částí: infundibium, zachycující folikuly z vaječníku, magnum, produkující bílek, istmus vytvářející vaječnou membránu a uterus formující skořápku (Gantois *et al.* 2009). V kloace se pak mohou mísit výkaly a tekutiny z vejcovodu a tak tvořit prostředí bohaté na bakterie (Lombardo *et al.* 1996). Faktory ovlivňující společenstvo bakterií v kloace mohou tak nakonec ovlivnit bakteriální společenstvo na povrchu skořápky.

3. Zdroje a typy mikroorganismů v hnízdním prostředí

Mezi mikroorganismy, se kterými se jedinci ve svém hnízdním habitatu setkávají, bezpochyby patří bakterie a mikroskopické houby. Vztahy mezi mikroskopickými houbami a ptáky nejsou dobře prozkoumány. To je překvapující, protože například ve studii Goodenough & Stallwood (2010) poukazují na to, že mikroskopické houby jsou podstatnou součástí hnízdní mikrocenózy a zaujímají 38 % všech mikroorganismů v hnízdě. Kromě mikroskopických hub mohou být snůšky kolonizovány především vzdušnými bakteriemi, bakteriemi rostoucími v hnízdním materiálu nebo bakteriemi přítomnými na kůži nebo v peří hnízdících ptáků.

Obecně existuje předpoklad, že na povrchu skořápky dominují gram-positivní bakterie, které lépe tolerují suché podmínky, zatímco gram-negativní bakterie se spíše vyskytují uvnitř vajec (Board 1966; Bruce & Drysdale 1994). Na druhou stranu se ukazuje, že druhové zastoupení bakterií detekovaných na povrchu či uvnitř vejce se může měnit v závislosti na zeměpisné šířce. Na skořápkách vajec exponovaných tropickým podmínkám prostředí byly nejčastěji nalezeny gram-positivní tyčinky (nejčastěji rod *Bacillus*), gram-positivní koky (rody *Staphylococcus* a *Micrococcus*), gram-negativní Enterobacteriaceae a Pseudomonadaceae a rovněž mikroskopické houby (rody *Candida*, *Trichoderma*). Naproti tomu, gram-negativní bakterie jako *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus* a *Pseudomonas*, gram-positivní koky (rod *Streptococcus*) a houby (rody *Fusarium*, *Aspergillus*) byly nalezeny ve vnitřních strukturách vajec (Cook *et al.* 2003, 2005b). V podmínkách mírného pásu se bakteriální společenstvo na povrchu skořápky a uvnitř vajec lišilo. Wang *et al.* (2011) našli na skořápkách vajec vystavených podmínkám mírného klimatu bakterie rodu *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter* a *Sporosarcina*. Jako jediné gram-negativní bakterie vyskytující se ve větším množství na povrchu skořápky byly bakterie rodu *Pantoea*. Do vaječného obsahu pak nejčastěji vstupovaly rody *Staphylococcus*, *Bacillus* a *Micrococcus*, avšak žádná kolonie izolovaná z vaječného obsahu nebyla gram-negativní. Nápadně uvnitř vejce chyběly také rody jako *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Escherichia* nebo *Proteus*, běžně se vyskytující ve zkažených či nevylihnutých vejcích (Board 1966; Bruce & Johnson 1978; Pinowski *et al.* 1994). Výsledky této studie tak kontrastují se studiemi Cook *et al.* (2003, 2005b), kde na skořápce dominovaly gram-positivní a uvnitř vejce gram-negativní bakterie. Zdá se tedy, že různé typy bakterií se liší svou schopností vstupovat a perzistovat ve vnitřních strukturách vejce, a to zřejmě v závislosti na podmínkách prostředí, které, jak bude zmíněno níže, bakteriální infekci vejce ovlivňují.

Výskyt těchto různých typů mikroorganismů v různých typech hnízdního prostředí podléhá časové i prostorové variabilitě (Goodenough & Stallwood 2010; Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011; Peralta-Sánchez *et al.* 2012). Goodenough & Stallwood (2010) zjišťovali odlišnosti bakteriálního zatížení hnízda mezi sympatrickými druhy, sýkorou koňadrou (*Parus major*) a sýkorou modřinkou (*Cyanistes caeruleus*), které sdílí velmi podobné hnízdní strategie. Z obou hnízd bylo izolováno 32 bakteriálních druhů a 13 druhů mikroskopických hub. Mezi hnízdy obou druhů byl významný rozdíl v přítomnosti *Pseudomonas aeruginosa*, který se našel pouze v hnízdech sýkory modřinky, která si do hnízda na rozdíl od sýkory koňadry přidává zelené rostliny. Podobně Peralta-Sánchez *et al.* (2012) zkoumali mezidruhové rozdíly v bakteriálním zatížení na skořápce 24 druhů ptáků a poukázali na to, že typ hnízda, použití peří nebo zelených rostlin v hnízdě a inkubační chování vysvětluje výrazné odlišnosti bakteriálního společenstva na povrchu skořápky. Jak ukazuje Ruiz-de-Castañeda *et al.* (2011) bakteriální zatížení na povrchu inkubovaných vajec může značně souviset s bakteriálním společenstvem v kloace samice, které může být ovlivněno složením potravy (Berger *et al.* 2003). Brittingham *et al.* (1988) objevili, že výskyt *Streptococcus* spp. byl vyšší u omnivorních druhů než u druhů granivorních. Přenos bakterií může být také asociován s přímou defekací samic na vejce během inkubace (Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011), nebo mohou být bakterie přenášeny přímo z opeření ptáků, které je silně kolonizováno nejrozličnějšími druhy bakterií (Bagott & Graeme-Cook 2002; Peralta-Sánchez *et al.* 2010). Výskyt těchto mezidruhových rozdílů v intenzitě a diverzitě bakteriálního společenstva nicméně může silně záviset na konkrétních podmínkách hnízdního prostředí. Jak již bylo zmíněno výše, v úvahu musíme brát vliv zeměpisné šířky, nadmořské výšky či také sezónní vlivy (Peralta-Sánchez *et al.* 2012).

4. Efekt přítomnosti mikroorganismů na povrchu a ve vnitřních strukturách vejce

V předchozích kapitolách byly popsány druhy mikroorganismů a mechanismy jejich přenosu jak na povrch, tak do vnitřních struktur vejce. Jaký je samotný efekt výskytu těchto mikroorganismů na povrchu a uvnitř vejce se pokusím nastínit v následujícím textu (shrnutí viz Tabulka 1).

Mnohé ze studií, které se riziku bakteriální infekce a jeho efektu věnovaly, prokazují, že bakterie mohou negativně působit především na líhnivost vajec. Bruce & Johnson (1978)

demonstrovali, že přítomnost *Pseudomonas* spp. uvnitř vejce vykazovala výraznou korelaci s poklesem líhnivosti. Cook *et al.* (2003) ve své studii exponovali vejce kura domácího (*Gallus gallus domesticus*) ve dvou habitatech tropického deštného lesa. V experimentu sledujícím líhnivost vždy polovinu exponovaných vajec dvakrát denně ošetřil 70% alkoholem, aby zničili mikroorganismy na skořápce a zabránili infekci vaječného obsahu. Alkoholem ošetřená vejce exponovaná podmínkám horského mlžného lesa vykazovala na konci experimentu 76,5% líhnivost, zatímco neošetřená vejce pouze 22,7%, což poukazuje na fakt, že mikroorganismy byly pravděpodobnou příčinou redukce líhnivosti. Podobně, 50-66% pokles líhnivosti ošetřených i neošetřených vajec byl zaznamenán při expozici vajec drozdce karibského (*Margarops fuscatus*) ve stejných podmínkách prostředí horského mlžného lesa, což na druhou stranu naznačuje různou životaschopnost vajec vlivem bakteriální infekce u ptáků altriciálních a prekociálních. Odlišná citlivost k mikrobiální infekci vajec může být způsobena různou tloušťkou skořápky nebo odlišným počtem pórů ve skořápce (Cook *et al.* 2005b). V kontrastu s tím, mikrobiální zatížení na povrchu (Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011) i ve vnitřních strukturách vejce (Wang *et al.* 2011) nesouviselo s úspěchem líhnivosti v klimatických podmínkách mírného pásu. Nicméně, infekce embrya a selhání líhnivosti nemusí záviset jen na množství bakterií, ale spíše na přítomnosti určitých patogenních kmenů, které umí překonat obranné bariéry vejce (Baggott & Graeme-Cook 2002). Také typ hnízda, v kterém jsou vejce vystavena okolním podmínkám, může mít vliv na líhnivost. Godard *et al.* (2007) ve svém experimentu se slepičími vejci exponovanými v umělých otevřených a dutinových hnízdech podmínkám mírného klimatu ukázali, že vejce v otevřených hnízdech vykazovala pokles líhnivosti spolu s dobou expozice, zatímco vejce v dutinových hnízdech nikoliv.

Posouzení přímého vztahu mezi bakteriální infekcí vnitřních struktur vajec s líhnivostí bylo provedeno také v recentní studii Javůrková *et al.* (2013 in press), kde exponovali vejce kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) v poloumělých hnízdech v přirozených podmínkách hnízdního habitatu. Z každého exponovaného vejce odebírali vaječný bílek a čistě molekulárními metodami jej testovali na přítomnost mikroorganismů. Nenašli žádné přímé spojení mezi úspěšnou líhnivostí a výskytem bakteriální infekce uvnitř vejce, ale jako první prokázali, že tělesná váha kachňat byla výrazně redukována u vajec pozitivních na přítomnost bakteriální infekce. Jedná se v podstatě o první důkaz toho, že bakteriální infekce uvnitř vejce může za určitých podmínek u daného druhu zásadně ovlivňovat kromě líhnivosti, také fenotyp vylíhlých mláďat.

Mezi jedny z dalších efektů přítomnosti mikroorganismů patří také negativní vliv na vývoj embrya, růst a přežití mládřat. Pinowski *et al.* (1994) ve své studii zkoumali nevylíhnutá vejce vrabce domácího (*Passer domesticus*) a vrabce polního (*Passer montanus*). Nevylíhnutá vejce z hnízd odebrali a testovali je na přítomnost mikroorganismů. Zjistili, že 70 % nevylíhnutých vajec bylo infikováno patogeny jako *Escherichia coli* nebo *Staphylococcus epidermitis*, které mohou inhibovat rozvoj embrya a způsobovat jeho smrt. Citlivost oplozených vajec k infekci *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermitis* popisuje ve své studii McCabe (1964). Ukazuje, že stafylokoky jsou extrémně letální pro vyvíjející se embryo a že embryo mladší než 10 dní jsou k infekci citlivější než embryo starší. Také Fonseca *et al.* (2011) poukazují na schopnost bakterie *Campylobacter jejuni* procházet vaječnými póry, vstupovat do vaječného obsahu a způsobovat mortalitu embrya.

Bakteriální infekce vejce může ovlivňovat růst a přežití mládřat také po vylíhnutí. Mikroorganismy přenesené do vnitřních struktur vejce ať už horizontální nebo vertikální cestou mohou vytvářet primární mikrocenózu střeva embrya a následně vylíhnutého mláděte. Bakterie přítomné v bílku a žloutku se totiž mohou dostat do střeva mláděte skrze postupné zužitkovávání bílku a žloutku vyvíjejícím se embryem. Lombardo *et al.* (1996) zkoumali u vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*) vztah mezi bakteriemi v kloace mládřat, jejich morfologickými parametry a úspěšností jejich vyvedení z hnízda. Kultivací získané bakteriální společenstvo mělo pozitivní vliv na délku křídla, ale negativní vliv na hmotnost mláděte. Bakterie přítomné v kloace však neměly žádný vliv na úspěšné vyvedení mládřat z hnízda. V jiné studii ovšem poukázali na pozitivní korelaci gram-negativních bakterií v kloace včetně *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. a *Shigella* spp. s asymetrií křídla potomků vlaštovky stromové (Lombardo & Thorpe 1999). Asymetrie křídla může zvyšovat náklady na let, redukovat výkon křídla a výrazně tak snižovat fitness (Norberg 1990, podle Lombardo & Thorpe 1999), jelikož letové schopnosti jsou kritickou vlastností pro přežití těchto vzdušných insektivorů. Podobně Moreno *et al.* (2003) ve své studii pozorovali vliv *Enterococcus faecalis*, běžného oportunního patogena ptáků, a *Enterococcus faecium*, který pomocí produkce bakteriocinů (látek podobných antibiotikům) kompetuje s patogenními bakteriemi v trávicím traktu, na fenotyp mládřat lejsků černohlavých (*Ficedula hypoleuca*). Přítomnost *Enterococcus faecalis* v kloace nevykazovala vliv na velikost mláděte, zatímco přítomnost *Enterococcus faecium* byla pozitivně korelována s růstem mláděte krátce před opeřením. Vyšší zatížení enterokoky měla také větší a těžší mládřata lejsků černohlavých ve studii (González-Braojos *et al.* 2011), ve které rovněž sledovali efekt střevních bakterií na růst mládřat v hnízdě.

V neposlední řadě se ukazuje, že přítomnost bakterií v hnízdním prostředí může souviset s kognitivními schopnostmi rodičů. Obecně se usuzuje, že parazité mohou do jisté míry ovlivňovat jak rozvoj či velikost mozku, tak také kognitivní schopnosti u ptáků (Overington *et al.* 2009). Soler *et al.* (2012b) ve své studii předpokládá, že druhy, které mají lepší behaviorální flexibilitu (např. vyšší podíl potravních inovací či schopnost naučit se rozlišovat parazitická vejce ve svém hnízdě), jsou druhy, které obývají mnoho typů více fragmentovaných habitatů, a přicházejí tedy častěji do styku s různými typy a intenzitami bakteriální zátěže, než např. druhy sedentární. Pokud tento předpoklad platí, měly by také snůšky těchto druhů trpět silnější bakteriální zátěží. Soler *et al.* (2012) ve své studii analyzoval stěry z 1100 hnízd 58 druhů ptáků a prokázal, že druhy s větším podílem potravních inovací a lepší schopností rozeznat parazitické vejce ve svém hnízdě nesly na povrchu svých snůšek intenzivnější bakteriální zátěž. Přestože je tato studie čistě korelativní a intenzivnější bakteriální zátěž snůšek u druhů s lepšími kognitivními schopnostmi je spíše důsledek, než příčina podílející se na evoluci kognitivních schopností u jednotlivých druhů ptáků, existují pro tento vztah jisté předpoklady.

5. Faktory ovlivňující přítomnost mikroorganismů na povrchu a uvnitř vejce

5.1 Hnízdní mikroklima

Mezi faktory ovlivňující riziko mikrobiální infekce patří především teplota. Nicméně studie, sledující vliv teploty přímo na bakteriální společenstva na povrchu vejce nejsou časté. Theron *et al.* (2003) experimentálně demonstrují vyšší počet bakterií na slepičích vejcích exponovaných vyšším teplotám než na vejcích exponovaných teplotám nižším. Clay & Board (1991) dokumentovali, že *Salmonella enteritidis* roste na skořápkách exponovaným teplotám kolem 25 °C, ale není schopná růst při 4-10 °C. Avšak Cook *et al.* (2003) poukazují na to, že v přírodních podmínkách nesou vejce v chladném humidním prostředí více bakterií na skořápce než vejce v teplých a suchých habitatech. V přirozených podmínkách hnízdního habitatu lze tedy předpokládat, že teplota prostředí působí na přítomnost mikroorganismů na vaječné skořápce a riziko proniknutí bakterií do vnitřních struktur vejce v těsné spolupráci s humiditou (Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011), která může ovlivňovat srážení vodních par na povrchu skořápky.

Voda se sráží na povrchu skořápky, pokud se vodní pára dostane do kontaktu se substrátem chladnějším než vzduch. K tomu může docházet především v podmínkách výrazné fluktuace teplot během hnízdění (D'Alba *et al.* 2010). Dalším zdrojem vlhkosti na vaječné skořápce mohou být také srážky. Berger *et al.* (2003) poukazují na to, že mikrobiální zatížení v hnízdních dutinách špačků obecných (*Sturnus vulgaris*) bylo pozitivně korelováno s intenzitou srážek. Bylo také prokázáno, že přítomnost vody na povrchu vajec podporuje růst a diverzifikaci mikroorganismů na skořápce (Board 1966; Board & Halls 1973; Board *et al.* 1979) a interakci mezi mikroorganismy na skořápce, kde může například sloužit k usnadnění tvorby biofilmu (společenstva mikroorganismů přichycených k povrchu, které se stávají odolnějšími a rezistentními vůči okolním podmínkám (O'Toole *et al.* 2000)). Je také důležitým médiem pro transport bakterií dovnitř vejce skrze póry ve skořápce (Board *et al.* 1979; Bruce & Drysdale 1994).

Je zřejmé, že podmínky hnízdního mikroklimatu (především teplota a humidita) jsou pro pravděpodobnost výskytu mikroorganismů zásadní. Kromě toho se ukazuje, že při dostatečném množství vody na skořápce jsou určité mikroorganismy schopné narušit vrstvu kutikuly (např. pseudomonády dokáží degradovat kutikulu vajec použitím proteáz (Board *et al.* 1979), stejně jako *Bacillus licheniformis* (Baggott & Graeme-Cook 2002)) a zvýšit tak množství pórů vhodných pro penetraci mikroorganismů z povrchu dovnitř vejce (Board & Halls 1973; Board *et al.* 1979).

5.2 Zeměpisné šířka (tropický vs. mírný pás)

Výsledky několika studií z posledních let naznačují, že mikrobiální infekce je sekundární příčinou redukce životaschopnosti vajec v tropech (Cook *et al.* 2003, 2005b), kde teplé, vlhké podmínky tropických deštných lesů vytváří náročné prostředí pro udržení životaschopnosti neinkubovaných vajec (Beissinger *et al.* 2005). Mikroorganismy tady vykazují vysokou diverzitu a abundanci a jejich růst a šíření není limitováno vlhkostí prostředí tak jako v prostředí mírného klimatu. To způsobuje, že mikrobiální zátěž snůšky v těchto klimatických podmínkách roste spolu s dobou její expozice (Cook *et al.* 2003, 2005b; Shawkey *et al.* 2009). Riziko mikrobiální infekce ale není v tropech všude stejné. Může se lišit se změnou podmínek prostředí podél výškového gradientu (Cook *et al.* 2003; Beissinger *et al.* 2005). Cook *et al.* (2003) vystavovali vejce kura domácího na dvou odlišných místech tropického lesa v Puerto Ricu. V mlžném lese (810 m.n.m.; 18-26 °C; humidita 77-100%) mikroby vstupovaly dovnitř vejce po pěti dnech u 60 % vajec a po sedmi dnech u 70 % vajec. V nížinném lese (20 m.n.m.; 23-31 °C; 65-97%) byl počet mikroorganismů nižší a k průniku bakterií dovnitř vejce

docházelo pomaleji, přesto infekce uvnitř vajec byla také značná – po pěti dnech bylo infikováno 25 % a po sedmi dnech 33 % vajec. Optimální podmínky v mlžném lese, především vyšší humidita, způsobily vysokou míru mikrobiální infekce na povrchu vajec, zatímco vyšší teploty a nižší humidita v nížinném lese redukovaly bakteriální růst na povrchu exponovaných snůšek.

Wang *et al.* (2011) se ve své studii zaměřili na to, zda přítomnost mikroorganismů ovlivňuje životaschopnost vajec přirozeně hnízdících dutinových pěvců salašníka západního (*Sialia mexicana*), vlaštovky stromové (*Tachycineta bicolor*) a vlaštovky zelené (*Tachycineta thalassina*) v podmínkách mírného podnebného pásu. Podmínky hnízdního prostředí korespondovaly s podmínkami určujícími nízké riziko bakteriální infekce. Počáteční mikrobiální zatížení na skořápkách bylo nízké, jelikož suché okolní podmínky v hnízdních budkách redukovaly možnost srážení vody na skořápce, což pravděpodobně vedlo k redukci infekce skrz skořápku. Wang *et al.* (2011) argumentují, že toto nízké riziko infekce vnitřních struktur vajec je důvodem pro poměrně vysokou líhivost vajec, která v mírném klimatu klesala i u dlouhodobě exponovaných snůšek pomaleji v porovnání s klimatem tropickým.

5.3 Typ hnízda a hnízdního materiálu

Na přítomnost mikroorganismů v hnízdě může mít vliv také typ hnízda a hnízdní materiál (Godard *et al.* 2007; Peralta-Sánchez *et al.* 2012). Ptáci mohou cíleně přizpůsobit vlastnosti hnízda podmínkám prostředí tak, aby vytvořili vhodné mikroklima pro rozvoj embrya a následně pro rostoucí potomky (Hansell 2000). Většina ptáků si staví nová hnízda každou hnízdní sezónu, zatímco používání stejného hnízda několik sezon je vzácné (Hansell 2000; Wiebe *et al.* 2007). Nicméně, pro ptáky hnízdící v dutinách je dostupnost nových míst pro umístění snůšky limitující, a proto často využívají dutiny a hnízda z minulé sezóny i přes riziko vysoké bakteriální zátěže (Clark & Mason 1988; Walls *et al.* 2012). Jak již bylo naznačeno, dutinové hnízdo nabízí konstantní a vhodné podmínky pro mikrobiální růst. Wang *et al.* (2011) prokázali, že vejce nakladená do starších hnízdících budek měla vyšší počáteční mikrobiální zatížení než vejce v nových budkách. To bylo pravděpodobně způsobeno akumulací výkalů, mikroskopických hub a dalších zdrojů mikroorganismů. Mikroskopické houby a bakterie mohou totiž přetrvávat ve výkalech a zbytcích hnízda v dormantním stavu a dokonce odolávat teplotám pod bodem mrazu (Hubálek 1978). Stáří hnízda může být tedy jednou z příčin vyššího bakteriálního zatížení na vejcích exponovaných ve znovu využívaných dutinách (Wang *et al.* 2011; Walls *et al.* 2012).

V této souvislosti je však nutno podotknout, že většina experimentálních studií vystavuje vejce podmínkám prostředí v uměle vytvořených hnízdních budkách (Godard *et al.* 2007; Wang *et al.* 2011). Přírodní dutiny mohou být ale izolovanější od vnějšího prostředí více než experimentální hnízdní budky. Na stinném místě mají dutiny tendenci být teplejší než uměle vytvořené hnízdní budky, zatímco na plném slunci se teploty mezi dutinami a budkami neliší (Stoleson & Beissinger 1999). Ve srovnání s přírodními dutinami mají tedy budky tendenci zvyšovat extrémy okolních teplot (Stolsen & Bessinger 1999), což opět poukazuje na opatrnost při interpretaci výstupů těchto studií.

Godard *et al.* (2007) poukazují na to, že ve většině studií, které exponují neinkubovaná vejce okolním podmínkám tak činí právě buď v přírodních dutinách nebo uměle vytvořených hnízdních budkách (Stolsen & Besinger 1999; Cook *et al.* 2003, 2005b; Beissinger *et al.* 2005). Ty mohou exponovaná vejce částečně chránit před podmínkami prostředí a také mikroklima hnízda je teplejší. Naproti tomu, hnízda postavena na zemi nebo na stromech, která jsou otevřena, jsou téměř vždy vystavena okolní vlhkosti a mohou zakoušet rapidnější změny a fluktuace teplot. To podle Godard *et al.* (2007) vede k vyšší míře infekce vnitřních struktur vejce a nižší líhivosti v otevřených hnízdech než v dutinových. Na vejcích v otevřených hnízdech byly také pravděpodobněji nalezeny mikroskopické houby (Godard *et al.* 2007), které mohou narušovat kutikulu a zvyšovat tak pravděpodobnost penetrace bakterií skrz skořápku (Cook *et al.* 2003). Je ovšem důležité zmínit, že hnízda používané Godard *et al.* (2007) byla před experimentem sterilizována, během experimentu vlhčena a neměla žádnou předchozí hnízdní aktivitu.

Taktéž hnízdní materiál může působit na společenstvo mikroorganismů v hníždě. Goodenough & Stallwood (2010) ukázali u dvou běžných dutinově hnízdících pěvců, sýkoře koňadře a sýkoře modřince, že odlišný hnízdní materiál může nést rozdílné mikroorganismy. Běžně používaný materiál k vystýlání hnízd je peří (Hansell 2000). Tradičně je využívání peří vysvětlováno jeho termo-izolační funkcí. Tato funkce je podpořena zabudováváním peří do hnízda časně hnízdících evropských pěvců nebo menších druhů na rozdíl od větších (Moller 1984). Mimo to obsahuje peří mikroorganismy, které mohou ovlivnit podmínky v hníždě a kolonizovat vaječný povrch (Peralta-Sanchez *et al.* 2010). Důležitou součástí mikroorganismů v peří jsou peří degradující bakterie, které často produkují antimikrobiální látky neboli bakteriociny, zabraňující růstu jiných mikroorganismů na vaječné skořápce (Gunderson 2008). Mezi nejhojnější patří *Bacillus licheniformis*, který je schopný na skořápce prosperovat i za inkubačních teplot (Bagott & Graeme-Cook 2002). Růst a přítomnost *B. licheniformis* a jiných bakterií je závislý na barvě peří, respektive na množství deponovaných pigmentů do

pera (Grande *et al.* 2004; Gunderson *et al.* 2008). Ukázalo se, že bílé peří, které neobsahuje melanin je více infikováno bakteriemi a také snadněji degradováno *B.licheniformis*, než peří tmavé (Gunderson *et al.* 2008), nicméně výsledky studií nejsou jednotné (Grande *et al.* 2004). Peralta-Sanchez *et al.* (2011) objevili redukované bakteriální zatížení na skořápkách vajec v experimentálních hnízdech s bílým peřím pravděpodobně v důsledku namnožení *B. licheniformis*, který potlačuje růst dalších bakterií, což vysvětluje preference bílého peří jako hnízdní výstelky u vlaštovky obecné (*Hirudo rustica*). Nicméně během inkubace se barevné složení peří v hnízdě změní, s tím, že na konci inkubace v hnízdě převládá peří tmavé. Peralta-Sanchez *et al.* (2011) tento jev vysvětlují tím, že neinkubovaná vejce jsou citlivější k infekci než inkubovaná (Cook *et al.* 2005b; Shawkey *et al.* 2009) a tedy by ochrana vajec měla být důležitější v časně než pozdní fázi inkubace.

6. Obranné mechanismy redukující přítomnost mikroorganismů na povrchu a uvnitř vejce

6.1 Inkubace

Inkubace hraje důležitou roli v reprodukci ptáků. Je důležitým evolučním nástrojem pro udržení vhodných podmínek pro vývoj embrya. Ptačí embryo se nevyvíjí při teplotě 24-27°C a tato hranice je známa jako fyziologická nula (Webb 1987; Decuypere & Michels 1992). Pokud okolní teplota převyšuje fyziologickou nulu, ale zůstává pod optimální inkubační teplotou (34-36°C), některé embryonální tkáně se začnou rozvíjet a spouští se abnormální vývoj embrya, který pak může vést k letálním teratogenním změnám. Nejcitlivější k těmto teplotám je rozvoj nervové tkáně a mozku u časných embryí (Webb 1987). Nicméně delší expozice teplotám pod fyziologickou nulu může také narušit životaschopnost vejce (Arnold 1993; Fassenko *et al.* 2001). K optimálnímu růstu embrya však nepochybně dochází jen při inkubačních teplotách (Webb 1987). Přes tento důležitý efekt inkubace zajišťovat životaschopnost a optimální vývoj embrya, se ukazuje, že inkubace může mít vliv na mikrobiální zátěž snůšky.

Ačkoli bylo riziko mikrobiální infekce jako potencionální selekční agens v evoluci rozdílných typů inkubace u ptáků doposud přehlíženo, z výsledků několika studií vyplývá, že by tomu tak být nemělo. Recentní studie totiž poukazují na roli inkubace také v obraně vejce před mikrobiální infekcí (Cook *et al.* 2005a; Shawkey *et al.* 2009). Jak již bylo naznačeno, bakterie a mikroskopické houby rapidně rostou na skořápkách nově nakladených vajec, které

jsou exponovány okolním podmínkám (Cook *et al.* 2005b). Ptáci kladou ne více než jedno vejce denně a většina druhů začíná plně inkubovat již se snesením prvního vejce (Clark & Wilson 1981). Takový způsob inkubace může být nezbytný pro udržení životaschopnosti embrya, ale také pro pokles pravděpodobnosti infekce vnitřních struktur vejce díky redukcí bakterií a mikroskopických hub na skořápce (Cook *et al.* 2005b; Ruiz-de-castañeda *et al.* 2012). Prevence mikrobiální infekce může tedy být adaptivním vysvětlením zahájení inkubace ihned po snesení prvního vejce do snůšky nebo také částečné inkubace, strategie využívané mnoha druhy ptáků, kdy samice během kladení snůšky inkubuje snesená vejce jen částečně v různě dlouhých intervalech před zahájením plné inkubace (Wang & Beissinger 2011). Plná inkubace snůšky u dutinově hnízdícího lejska černohlavého začíná v horském habitatu mírného pásu ve Španělsku většinou během 4. dne od nakladení prvního vejce. Začátek inkubace v noci je vzácný, což je vysvětlováno nižšími teplotami během noci, které limitují metabolickou aktivitu většiny bakterií a jejich růst (Ruiz-de-castañeda *et al.* 2012). Cook *et al.* (2005b) a Shawkey *et al.* (2009) demonstrovali jak kultivačně, tak molekulárními metodami, že částečná inkubace inhibuje růst bakterií na skořápce tropických druhů pěvců. Tento efekt byl následně prokázán také u druhů pěvců mírného klimatu (D'Alba *et al.* 2010; Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2011; Ruiz-de-castañeda *et al.* 2012; Walls *et al.* 2012). Cook *et al.* (2005a) ve své studii poukazují také na fakt, že po 3 dnech expozice byla neinkubovaná vejce drozdce karibského pravděpodobněji kolonizována potenciálně patogenními gram-negativními fermentory a gram-positivními koky, zatímco gram-positivní tyčinky, které zřídka vstupují dovnitř vejce (Cook *et al.* 2003, 2005b), měli tendenci růst spíše na inkubovaných než na neinkubovaných vejcích. Na druhou stranu, Shawkey *et al.* (2009) ve své studii založené pouze na molekulární determinaci bakterií demonstruje, že inkubace inhibuje bakterie rostoucí na skořápce. Její efekt je tedy spíše bakteriostatický a nepodporuje ani neeliminuje růst specifických bakterií.

Existuje několik mechanismů, kterými může inkubace inhibovat růst bakterií na povrchu a uvnitř vejce. Inkubace může minimalizovat růst patogenních a kutikulu trávících mikroorganismů redukcí vody a vlhkosti na povrchu vajec, čímž limituje pravděpodobnost infekce vnitřních struktur vejce. Cook *et al.* (2003,2005b) jako první uvažují o možnosti, že při inkubaci mohou ptáci potenciálně minimalizovat růst škodlivých bakterií redukcí vlhkosti na skořápce. D'Alba *et al.* (2010) provádí první experiment, kdy exponovali přirozeně inkubovaná a neinkubovaná vejce vlaštovky stromové okolní nebo zvýšené humiditě. Pozorovali, že obě neinkubované skupiny měli vyšší mikrobiální růst než přirozeně inkubované kontrolní skupiny vajec. Poskytují tak první důkaz, který poukazuje na to, že

udržení vajec suchých je bezprostřední mechanismus inkubace redukující bakteriální růst na skořápce vejce. Toto tvrzení podporuje také experiment Ruiz-De-Castañeda *et al.* (2011), kteří exponovali a inkubovali vejce lejska černohlavého a zjistili, že „vysoušecí“ efekt inkubace limituje bakteriální růst na skořápce. Vliv inkubace na udržení vajec suchých může nabývat na významu u ptáků hnízdících v otevřených hnízdech, která jsou vystaveny více dešti, nebo v habitatech s vydatnými srážkami, vysokou humiditou a velkými fluktuacemi teplot během hnízdní sezony (D’Alba *et al.* 2010). Nicméně Ruiz-De-Castañeda *et al.* (2011) poukazuje také na to, že na různé typy bakterií působí „vysoušecí efekt“ inkubace odlišně. V jeho studii byly ke snížení relativní humidity citlivější heterotrofní bakterie a pseudomonády, zatímco na gram-negativní bakterie snížení relativní vlhkosti nepůsobilo

K eliminaci vody na skořápce dochází několika způsoby. Zvýšením teploty vajec se může voda na skořápce vypařovat rychleji (Cook *et al.* 2003, 2005a,b) a zároveň zabránit kondenzaci vodní páry na zahřátém vejci vlivem okolních teplot. Během inkubace může také docházet ke snižování celkové vlhkosti v okolí vejce a snižování obsahu vzdušného výparu z hnízda (D’Alba *et al.* 2010). Voda může být z vejce odstraněna také nasátím do peří v okolí hnízdních nažin inkubujícího rodiče, které jsou v kontaktu s inkubovanými vejci (Gill 1995). Dalším mechanismem vytvářejícím antimikrobiální vliv inkubace je přenos tepla dovnitř vejce. Pokud bakterie infikují vaječný obsah, inkubace poskytuje dodatečnou ochranu proti růstu bakterií uvnitř vejce zvýšením teploty bílku na úroveň, při které se nejlépe aktivují antimikrobiální proteiny bílku (Board & Tranter 1986) (více níže). Mimo to částečná inkubace může být nezbytná k redukci růstu a patogenního efektu vertikálně přenášených mikroorganismů, bez ohledu na riziko infekce vnitřních struktur vejce. Nicméně teplota a trvání zahřívání požadované k ochraně vajec před mikrobiální zátěží v před-inkubačním období nejsou dobře známy (viz. také Cook *et al.* 2005b).

Mezi obranné mechanismy inkubace může také patřit eliminace patogenních bakterií na skořápce založené na zvyšování růstu komenzálních a symbiotických bakterií, které jsou schopné kompetitivně vyloučit patogeny (Soler *et al.* 2010). Je známo, že ptáci syntetizují sekrety v uropygiální žláze, a ty jsou pak nanášeny na opeření. Toto ošetřování peří je mimo jiné namířeno proti mikroorganismům nacházejícím se v peří ptáků (Shawkey *et al.* 2003). Sekrety uropygiální žlázy totiž obsahují organické látky s antimikrobiálním účinkem (Martín-Vivaldi *et al.* 2010), které mohou díky kontaktu peří inkubujícího jedince s povrchem vejce měnit bakteriální společenstva na povrchu skořápky. Soler *et al.* (2008) experimentálně deaktivoval antimikrobiální peptidy ze sekretů uropygiální žlázy dodáním proteáz na povrch vajec a sledoval efekt na bakteriální růst na skořápce a na líhivost. Inaktivace peptidů

v hnízdech evropských dudků (*Upupa epops*) způsobila relativně vysokou bakteriální infekci a neúspěch líhnivosti vajec. To podporuje mutualistický vztah mezi bakterií druhu *Enterococcus faecalis* žijící v uropygiální žláze, která poskytuje hostiteli látky, které inhibují růst patogenních bakterií v peří a na povrchu inkubovaných vajec (Martin-Platero *et al.* 2006). Nicméně, sekrety uropygiální žlázy také podporují proliferaci roztočů v peří, kteří se sekrety uropygiální žlázy a detritem na kůži a v peří obsahujícím také bakterie živí. Tyto roztoči tak mohou zabránit tomu, aby bakterie z peří během inkubace dosáhly povrchu vejce. Mezi roztoči a ptačím hostitelem tak může působit mutualismus poskytující roztočům dostatek potravy a ptačím hostitelům redukci bakteriálního růstu na povrchu vajec (Soler *et al.* 2012a). Tento vztah je však téměř nestudován a vyžaduje další testování.

6.2 Mechanické a chemické bariéry vejce

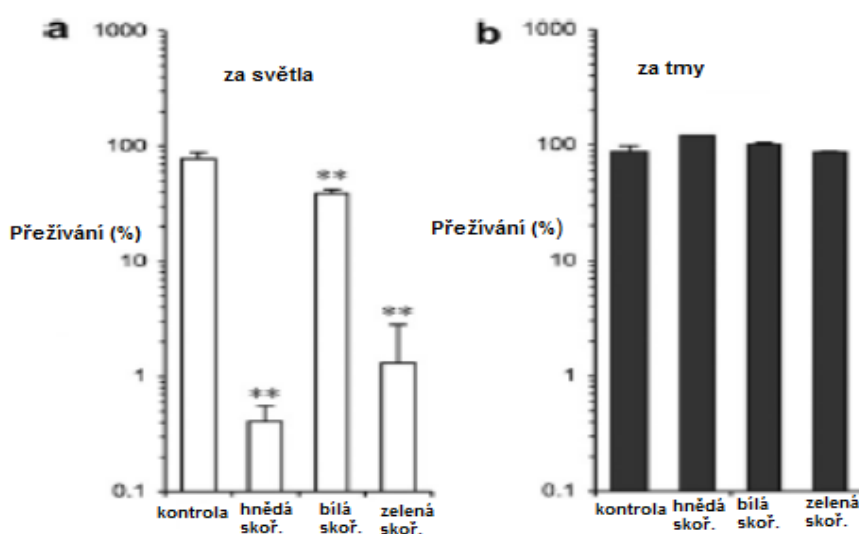
6.2.1 Kutikula

K potlačení šíření mikroorganismů na povrchu vejce a následné penetrace do jeho vnitřních struktur vznikly na povrchu i uvnitř vejce mechanické a chemické bariéry (Board 1966; Board & Fuller 1994; Gantois *et al.* 2009). V přímém kontaktu s vnějším prostředím je vaječná kutikula, tenká vrstva z proteinů, lipidů a krystalků hydroxyl apatitu na povrchu skořápky (Wellman-Labadie *et al.* 2007). Kutikula redukuje ztrátu vody z vajíčka a je v první linii v obraně proti vstupu mikroorganismů dovnitř vejce také díky obsahu antimikrobiálních proteinů (Board & Halls 1973). Nicméně, mechanická obranná funkce je u čerstvě nakladených vajec omezena, jelikož kutikula teprve postupně zasychá a uzavírá povrch vejce. V tomto období tedy může docházet k penetraci mikroorganismů skrze obnažené póry dovnitř vejce (Sparks & Board 1985).

6.2.2 Pigmentace vaječné skořápky

V obraně vaječného obsahu proti mikrobiální infekci mohou hrát roli také pigmenty uložené ve vaječné skořápce. Je obecně známo, že bakterie zabíjí expozice UV-B radiací (Scott 1993; Chavez *et al.* 2002). Krátká UV-B expozice (1-2 hodiny) na snůšku během inkubace vede ke zvýšení úspěšného líhnutí a rozvoji embrya ve srovnání s vejci inkubovanými ve tmě. V kontrastu s tím delší intervaly vystavení vajec radiaci zapříčinily zvýšení mortality embryí (Veterány *et al.* 2004). Bezpečné množství radiace může být tak kontrolováno pigmenty ve skořápce. Protoporfyrin, červeno-hnědý pigment, a biliverdin, modro-zelený pigment, jsou hlavními pigmenty skořápky (Kennedy & Vevers 1976). Shafey *et al.* (2005) ve své studii

ukázali, že propustnost UV byla nižší u vajec s vyšší intenzitou hnědé pigmentace. Pigmenty mohou tedy sloužit jako antibakteriální obrana vejce skrze indukci a změny v UV záření na povrchu skořápky. Antimikrobiální potenciál vaječných pigmentů tkví také v tzv. fotodynamické aktivitě. Ishikawa *et al.* (2010) testovali fotodynamickou inaktivaci dvou gram-positivních bakterií (*Staphylococcus aureus* a *Bacillus cereus*) a dvou gram-negativních bakterií (*Escherichia coli* a *Salmonella enteritis*) na povrchu hnědých skořápek plemene kura domácího (Rhode Island Red hens). Vystavení gram-positivních bakterií světlu zapříčinilo jejich značný pokles, zatímco gram-negativní bakterie na skořápce vystavené světlu nevykazovaly žádné změny v početnosti. Ke zjištění fotodynamické aktivity různě zbarvených skořápek byl *Staphylococcus aureus* inkubován na skořápkách hnědých, bílých a zelených a poté byly tyto různě zbarvené skořápky vystaveny světlu nebo tmě. Osvětlení hnědých, bílých i zelených skořápek po dobu 60 minut výrazně snižovalo přežití *S. aureus*. Oproti tomu, *S. aureus* na skořápkách vystavených pouze tmavému prostředí nevykazoval výraznou změnu v přežití (viz Obrázek 1). Odlišnosti ve fotodynamické antimikrobiální aktivitě různě zbarvených skořápek mohou být tedy s velkou pravděpodobností závislé na typu a množství pigmentu uloženého ve skořápce. U druhů, kde inkubace začíná po naklazení posledního vejce, samice mohou použít pigmentaci k antibakteriální ochraně prvně nakladených vajec. Tyto prvně nakladená vejce pak mohou vykazovat vyšší množství a koncentraci protoporfyrinu ve skořápkách než později nakladená vejce. Tmavěji zbarvená prvně nakladená vejce se vyskytují u racků a brodivých (Hockey 1982; Verbeek 1988) a mohou tedy sloužit k ochraně embrya při delší expozici okolním podmínkám prostředí.



Obr. 1. Fotodynamický vliv různě zbarvených skořápek na bakteriální přežívání.

Staphylococcus aureus byl inkubován s hnědými, bílými a zelenými skořápkami a) za světla a b) za tmy 60 minut ve 37 °C. Kontrola byla inkubována bez skořápky. Převzato: Ishikawa *et al.* 2010.

Je známo, že gram-negativní bakterie jsou citlivé k vyschnutí (Board 1966). Vystavení vajec slunečnímu záření, které zajistí suchý a teplý povrch skořápky, může být dalším mechanismem v redukci gram-negativních bakterií na povrchu vejce. Vaječné pigmenty mohou usnadnit tuto expozici blokováním nebo odrážením UV a infračerveného záření. Pigmentace skořápky může dále pomoci tomuto procesu tím, že tmavší skořápky se mohou zahřívat rychleji než čistě bílé skořápky (Bakken *et al.* 1978; Maurer *et al.* 2011).

Cassey *et al.* (2012) ve své komparativní studii založené na analýze pigmentů ve skořápkách 49 rodů ptáků prokázal, že protoporfyrin byl nalezen ve vyšších koncentracích u dutinových a na zemi hnízdících druhů ptáků, zatímco biliverdin dominoval u druhů hnízdících v otevřených hnízdech s biparentální péčí. Zvýšená koncentrace protoporfyrinu tedy pravděpodobně souvisí s hnízdním habitatem, který poskytuje vhodné podmínky pro zvýšené riziko mikrobiální infekce snůšky (viz. také Cook *et al.* 2005b). Rozdíly v pigmentaci vajec tak mohou souviset s hnízdními strategiemi jednotlivých druhů ptáků díky své ochranné roli v eliminaci rizika mikrobiální infekce vejce.

6.2.3 Antimikrobiální proteiny bílku

Kromě kutikuly a pigmentů, poskytuje chemickou obranu vaječného obsahu před mikrobiální infekcí primárně zásadité pH a přítomnost antimikrobiálních proteinů bílku, které vytváří nevhodné prostředí pro mikrobiální růst (Board 1966). Antimikrobiální proteiny bílku mohou na mikroorganismy působit dvěma způsoby. Bakteriostatické proteiny inhibují bakteriální růst limitací dostupnosti základních prvků nebo inhibují metabolismus, zatímco baktericidní proteiny štěpí buněčné stěny a rozbíjejí membránový potenciál bakterií (Wellman-Labadie *et al.* 2007). Ovotransferrin, hlavní antimikrobiální protein, je složen ze dvou domén, které obě reverzibilně vážou železo. Omezují tak množství tohoto základního prvku a inhibují růst mikroorganismů (Phelps & Antonini 1975). Avidin je dalším antimikrobiálním proteinem bílku, který váže biotin, vitamín nezbytný pro růst většiny mikrobů. Lysozym, třetí významný antimikrobiální protein katalyzuje lyzi gram-positivních bakterií hydrolýzou peptidoglykanu v jejich stěnách (Wellman-Labadie *et al.* 2007) Aktivita těchto antimikrobiálních proteinů je vyšší při inkubační teplotě než při okolních teplotách (Board & Tranter; Wellman-Labadie *et al.* 2008) a roste s jejich vzrůstající koncentrací (Salton 1957). Některé studie poukazují na vyšší koncentraci antimikrobiálních proteinů v bílku a tlustší skořápky u ptáků hnízdících v dutinách, kteří mohou být vystaveni většímu riziku mikrobiální infekce (Board 1966, Wellman-Labadie *et al.* 2008). Mimo to není bílek jen ochranou chemickou ale také mechanickou. Viskozita bílkovinných proteinů brání pohybu bakterií směrem ke žloutku a

bílkovinný vak čerstvých vajec udržuje žloutek v centrální poloze, což brání kontaktu s případně kontaminovanou vaječnou membránou (Board 1966). Kromě toho dochází během embryonálního vývoje k dynamickým změnám ve viskozitě a chemických parametrech bílku (Romanoff 1943). pH bílku stoupne na hodnotu vyšší než 9,5 druhý den inkubace a poté se postupně vrací k neutralitě, a původní hodnoty pH 7,6 dosáhne po pěti dnech inkubace (Fang *et al.* 2012a). Během časně inkubace ovšem dojde také ke zkapalnění bílku, což teoreticky může ohrozit riziko infekce žloutku a embrya. Fang *et al.* (2012b) se ve své studii zabývá antimikrobiálním potenciálem bílku v časných stádiích embryonálního vývoje a poukazuje na to, že zkapalnění bílku pravděpodobně limituje antimikrobiální složky bílkovinných proteinů, ale antimikrobiální funkce je nahrazena vysokým pH bílku zcela nevhodným pro bakteriální růst.

Samice hnízdících ptáků mohou na zvýšené riziko bakteriální infekce reagovat také skrze časně maternální efekty a ovlivňovat tak vrozenou imunitu mláďat. Samice mohou adaptivně modifikovat složení vajec skrz různé ukládání specifických komponentů, například antimikrobiálních proteinů bílku (Board & Tranter 1986). Vysokou antimikrobiální ochranu embrya poskytují samice potomkům prostřednictvím lysozymu, který se hromadí v jejich reprodukčních orgánech a v době kladení přechází do bílku. První nakladené vejce obsahuje největší množství lysozymu, možná proto, že je nejdéle vystaveno expozici okolním podmínkám, tedy i bakteriální infekci (Saino *et al.* 2002). Nicméně tento trend se zcela nepotvrdil v dalších studiích (podrobnosti viz. Tabulka 2). Shawkey *et al.* (2008) zkoumal koncentraci a distribuci antimikrobiálních proteinů v bílku spolu s pořadím kladení u osmi druhů ptáků lišících se způsoby hnízdění a hnízdním habitatem. U některých druhů prokázal výrazné změny v koncentraci ovotransferrinu a avidinu s pořadím kladení vajec a mimo jiné poukázal na to, že podmínky prostředí, hnízdní habitat a mikrobiální zatížení v hnízdě může řídit evoluci optimální koncentrace proteinů u jednotlivých druhů.

V jiné studii Horrocks (2012) testoval, jestli koncentrace antimikrobiálních proteinů bude vyšší ve vejcích nakladených v humidnějších podmínkách, tedy v podmínkách příhodných pro růst mikroorganismů (Cook *et al.* 2003). Sbíral vejce skřivanů (*Alaudidae*) žijících podél vlhkostního gradientu a měřil koncentraci ovotransferrinu a lysozymu. Zjistil, že koncentrace ovotransferrinu byla vyšší u vajec z humidnějších podmínek. Naproti tomu, koncentrace lysozymu byla nižší ve vejcích v humidním prostředí a negativně korelovala s úrovní ovotransferrinu. To může být způsobeno existencí trade-off mezi proteiny nebo odlišnou efektivitou proteinů na různé mikroorganismy. Za další faktor prostředí ovlivňující deponaci antimikrobiálních složek do vejce je považována teplota. Koncentrace lysozymu

byla pozitivně korelována s okolní teplotou ve studii Horrocks (2012). Cucco *et al.* (2009) zkoumal efekt teploty v pěti dnech předcházejících kladení mimo jiné na lysozym a avidin v bílku. Koncentrace lysozymu se neměnila v souvislosti s teplotou, zatímco koncentrace avidinu pozitivně souvisela s teplotou den před kladením. Je důležité poznamenat, že studie byla prováděna na koroptvi polní (*Perdix perdix*) v chovu, kde nebyly samice omezovány resp. zvýhodněny dostupností potravy. V kontrastu s tím (Saino *et al.* 2004) analyzoval koncentraci antimikrobiálních proteinů ve vztahu k okolní teplotě během hnízdní sezony vlaštovky obecné a poukázal na to, že teplota během doby před kladením má pozitivní vliv na koncentraci lysozymu. Přímý vliv teploty je ale v této studii nejasný, protože zvýšení teploty může ovlivnit množství hmyzu a tedy dostupnost potravy pro tyto insektivory. Koncentrace antimikrobiálních proteinů mohla být tedy ovlivněna spíše potravou než vhodnými teplotními podmínkami.

Mimo to výkonný imunitní systém rodičů indukovaný zvýšeným rizikem bakteriální zátěže může snižovat riziko vertikálního přenosu a redukovat míru kolonizace skořápky bakteriemi, které jsou pro embryo patogenní (Soler *et al.* 2011a).

6.3 Zabudovávání zelených rostlin do hnízda a hnízdní výstelky

Mnoho druhů ptáků používá části čerstvých zelených rostlin jako hnízdní materiál. (Sengupta & Sengupta 1981) pozorovali vrabce domácí, kteří do svého hnízda přinášeli listy zaderachu indického (*Azadirachta indica*). Čerstvé listky doplňovaly od začátku stavby hnízda až po vylétnutí mláďat. Při experimentálním odebrání čerstvých listů z hnízda se kladení opozdilo a listy byly do hnízda znovu doplněny. Možným vysvětlením tohoto chování je zabránění negativnímu vlivu parazitů a patogenů v hnízdě (tzv. „nest protection hypothesis“). U špačků obecných je sezónní nárůst bakterií a ektoparazitů v hnízdě asociován s množstvím zeleného materiálu přineseného před snůškou do hnízda. V hnízdech s větším množstvím čerstvých rostlin bylo bakteriální zatížení menší (Gwinner & Berger 2005). Negativní vliv na množství a diverzitu bakterií na těle mláďat měli také rostliny přinesené do hnízda sýkory modřinky na Korsice (Mennerat *et al.* 2009). Clark & Mason (1985) poukázali u špačků obecných také na to, že ti, kteří hnízdí ve svých dutinových hnízdech opakovaně, zabudovávali zelené rostliny do svého hnízda šestkrát častěji než ptáci, kteří si stavěli si hnízda nová. Rostliny vybírané jako hnízdní materiál byly obvykle aromatické a obsah aromatických látek byl ve vyšší koncentraci vzhledem k ostatním rostlinám dostupným v habitatu. Aromatické látky mohou být totiž toxické a působit jako přirozené fumiganty (plynné látky využívané jako desinfekce) (Wimberger 1984; Clark & Mason 1985). Aromatické sloučeniny jsou pak v hnízdě

detekovatelné ještě několik týdnů po tom, co se rostlina rozloží (Gwinner & Berger 2005). Mezi preferované rostliny severoamerických špačků patřily mrkev obecná (*Daucus carota*), turan filadelfský (*Erigeron philadelphicus*), řepík malokvětý (*agrimonia parviflora*), řebříček obecný (*achillea millefolium*) nebo hluchavka nachová (*lamium purpureum*), které měli různý vliv na různé bakterie v hnízdě (Clark & Mason 1985, 1988)(více k tomuto viz Obrázek 2). Sýkory modřinky na Korsice preferovaly levanduli korunkatou (*Lavandula stoechas*), nebo mátu vonnou (*Mentha suaveolens*).

Nicméně studie testující tuto hypotézu jsou zaměřené především na ektoparazity a jejich vliv na fenotyp mláďat (Clark & Mason 1988; Gwinner *et al.* 2000; Mennerat *et al.* 2009). Zkoumání bakterií v hnízdě a vlivu zelených rostlin na jejich přítomnost je vzácné (Clark & Mason 1985; Gwinner & Berger 2005; Mennerat *et al.* 2009). Mimo to, i tyto studie sledují negativní vliv bakterií ne na povrchu vejce, ale na povrchu mláďat nebo v hnízdě. Nicméně i to je důkaz, že zelené rostliny mohou ovlivňovat bakteriální společenstvo hnízda.

rostlinné druhy	bakteriální druhy				
	Se	Pa	Ec	Sa	NB
<i>Lamium purpureum</i> *					
<i>Daucus carota</i> *		+		+	
<i>Achillea millefolium</i> *					+
<i>Agrimonia parviflora</i> *	++			++	++
<i>Solidago rugosa</i> *				+	+
<i>Solidago ulmiflora</i>					
<i>Conium maculatum</i>					
<i>Polemonium reptans</i>					
<i>Glechoma hederacea</i>					
<i>Geum virginianum</i>					
<i>Geum canadense</i>				+	
<i>Taraxacum officinale</i>					
<i>Lonicera japonica</i>				+	-
<i>Alliaria officinalis</i>					+
<i>Senecio obvatus</i>					+
Unk 21					
<i>Viola</i> sp.					

Obr. 2. Disková difúzní metoda. Účinnost nesterilizovaného rostlinného materiálu v inhibici bakteriálního růstu na živném médiu. Symboly: „++“ vysoká účinnost rostlin, „+“ mírně účinné rostliny, prázdné místo označuje neúčinné rostliny, „-“ netestované rostliny, „*“ druhy rostlin klasifikované jako preferované špačky. Se *Staphylococcus epidermitis*, Pa *Pseudomonas aeruginosa*, Ec *Escherichia coli*, Sa *Streptococcus aurealia*, NB stěry z hnízd a hnízdních boxů, Unk 21 neidentifikovaný rostlinný druh. Převzato: Clark & Mason 1985.

Všechny obranné mechanismy, které byly testovány na potlačení mikrobiální infekce na povrchu vejce, a jejich prokázané efekty jsou shrnuty v tabulce 3.

7. Potenciální evoluční důsledky vlivu mikroorganismů na reprodukční strategie ptáků

7.1 Inkubační „pattern“ a synchronní vs. asynchronní líhnutí

Ptáci ovlivňují počátek rozvoje a výslednou synchronicitu líhnutí potomků skrz začátek inkubace. Kladou ne více než jedno vejce denně a většina druhů počíná inkubaci před naklazením celé snůšky (Clark & Wilson 1981). Toto chování, které způsobí, že prvně nakladené vejce dostane vývojovou výhodu a snůška se líhne asynchronně, často vede k mortalitě poslední vylíhnutého mláděte (Stoleson & Beissinger 1999; Cook *et al.* 2003). Počátek inkubace tak může být nahlížen jako trade-off mezi výhodou udržení životaschopnosti prvně nakladeného vejce a nevýhodou asynchronního líhnutí snůšky (Bessinger 1999). Stolssen & Bessinger (1999) navrhuje, že vztah mezi okolními teplotami a životaschopností vajec může přispět k sezónnímu a latitudinálnímu trendu zvyšování pravděpodobnosti asynchronního líhnutí u tropických druhů. Mikrobiální procesy, které působí nezávisle na teplotě, však také narušují životaschopnost vajec a mohou tak vytvářet tlak na inkubační strategie ptáků (Cook *et al.* 2003, 2003). Nicméně mikroorganismy jsou všudypřítomné a závisí na různých podmínkách prostředí, zda dojde k jejich růstu a proliferaci na povrchu a uvnitř vajec.

Vliv vzrůstající teploty během dne má pozitivní vliv na růst a množení bakterií. Fakt, že částečná inkubace začíná a děje se hlavně během dne by tedy mohl být výsledek nezbytnosti kontrolovat růst bakterií na povrchu vajec v podmínkách příhodných pro jejich růst. Naopak nižší teploty během noci limitují metabolickou aktivitu většiny bakterií, což vysvětluje minimální částečnou inkubaci během noci (Ruiz-de-castañeda *et al.* 2012). To je také protichůdné hypotéze, že počátek částečné inkubace během kladení je určen potřebou termoregulace (Veiga *et al.* 1992). Částečná inkubace před začátkem plné inkubace by tedy mohla být důsledkem silného selekčního tlaku ze strany mikroorganismů v podmínkách jim vyhovujícím (Ruiz-de-castañeda *et al.* 2012).

Jak již bylo řečeno, výrazný vliv inkubace jako obranného mechanismu nabývá na významu zvláště v prostředích s vysokou humiditou nebo velkými fluktuacemi teplot během dne a noci (D'Alba *et al.* 2010). U tropických druhů ptáků můžeme tedy očekávat časnější počátek inkubace, vedoucí ke snížení rizika mikrobiální infekce (Cook *et al.* 2005b). Naopak zpoždění počátku inkubace 3-5 dní do doby snesení předposledního nebo posledního vejce může udržet synchronní líhnutí snůšky bez velkého trade-off mezi mortalitou způsobenou

mikroorganismy a životaschopností vajec v podmínkách mírného pásu, kde teplota zřídka překročí fyziologickou nulu a nízké vlhkostní podmínky a dochází tak k eliminaci negativního vlivu mikrobiální infekce na vejce (Wang *et al.* 2011).

7.2 Velikost snůšky ptáků hnízdících v tropickém vs. mírném podnebném pásu

Mikroorganismy či teplotou ovlivněná životaschopnost vajec může vytvářet selekční tlak na rozdíly ve velikosti snůšky u tropických druhů ptáků a ptáků žijících v podmínkách mírného klimatu. Pokud náklady na fitness asynchronně se líhnoucích a kompetujících si potomků v hnízdě převýší výhody vyšší životaschopnosti prvně nakladených vajec, pak bude selekce volit redukci snůšky (Bessinger 1999). Pokud tedy nepříznivé podmínky prostředí, ať už teploty převyšující fyziologickou nulu nebo vysoké mikrobiální zatížení, zvyšují pravděpodobnost mortality embrya a snižují tak líhnivost vajec, měl by počet vajec ve snůšce klesat. To může být jedním z vysvětlení toho, proč velikost snůšky většiny tropických ptáků zřídka překračuje 3 vejce (Skutch 1985). Nicméně studie, které by přímo prokazovaly vztah mezi intenzitami bakteriální zátěže kladené na snůšky přirozeně hnízdících tropických druhů ptáků neexistují a dostupné experimentální studie trpí metodickými nedostatky (více k této problematice viz. kapitola 8. Metodické nedostatky současných studií).

7.3 Pigmentace vajec druhů s rozdílnými hnízdními strategiemi

Dalším evolučním důsledkem selekčního tlaku mikroorganismů může být rozdílná pigmentace vajec druhů lišících se ve svých hnízdních strategiích. Červeno-hnědá pigmentace vajec způsobena pigmentem protoporfyrinem je dávana do souvislosti především s krypsí snůšky (Weidinger 2001). Jak bylo naznačeno, vyšší koncentrace protoporfyriu se však objevuje také u vajec dutinových ptáků, což může souviset s obrannou snůšky před mikrobiální infekcí vejce v prostředí znovu užívané hnízdní dutiny s vysokými intenzitami mikrobiálního zatížení (Cassey *et al.* 2012). Stejně tak u druhů, kde inkubace začíná po naklazení posledního vejce, mohou samice použít pigmentaci s antimikrobiální aktivitou k ochraně prvně nakladených vajec.

Přestože existují studie, prokazující rozdíly v intenzitě pigmentace prvně nakladených vajec ve snůšce (Hockey 1982; Verbeek 1988), stejně tak studie prokazující vyšší koncentrace protoporfyriu ve snůškách dutinových druhů ptáků (Cassey *et al.* 2012), evoluce pigmentace vajec je složitá problematika podložena mnoha hypotézami (Maurer *et al.* 2011), z nichž ta, poukazující na antimikrobiální význam pigmentů je studována pouze okrajově a její další testování je tedy nezbytné.

8. Metodické nedostatky studií zabývajících se vztahem mikroorganismů a reprodukčních strategií ptáků

8.1 Metody používané pro determinaci mikroorganismů a jejich negativní důsledky na interpretační úroveň současných studií

Převážná většina studií popisující intenzitu a diverzitu bakteriální zátěže na povrchu a uvnitř vejce je založena na kultivačních metodách. Ty jsou však schopné identifikovat jen omezenou podmnožinu přítomných mikroorganismů (Brittingham *et al.* 1988; Lombardo *et al.* 1996; Stewart & Rambo 2000; Berger *et al.* 2003; Soler *et al.* 2011b), jelikož média pro kultivaci jsou často vybírána na základě předchozích studií tak, aby detekovala pouze běžné skupiny bakterií žijících na povrchu vaječné skořápky či uvnitř vejce. Zároveň je známo, že pouze zlomek (cca 3%) veškerých bakterií vyskytujících se v prostředí je kultivovatelných v laboratorních podmínkách (Amann *et al.* 1995). Tento fakt je zvláště patrný porovnáme-li bakteriální společenstva na povrchu skořápky zjištěné běžnými kultivačními metodami (Cook *et al.* 2003) s bakteriálními společenstvy na skořápkách mnoha druhů pěvců, ve studii, která použila čistě molekulární metody (Shawkey *et al.* 2009). Je tedy zřejmé, že výsledky studií využívající pouze kultivační metody pro detekci mikroorganismů jsou značně podhodnocené a při jejich interpretaci je nutná opatrnost.

Je také nutno zdůraznit, že většina studií zabývajících se efektem mikroorganismů na reprodukční a fenotypové charakteristiky používá jako proměnnou pro intenzitu bakteriální infekce uvnitř vejce pouze bakteriální zatížení na povrchu skořápky. Všechny tyto studie tak předpokládají, že veškeré bakterie nacházející se na povrchu vejce jsou schopné penetrovat do jeho vnitřních struktur a množit se zde. Tato domněnka však není opodstatněná, jelikož neexistuje studie, která by porovnávala rozdíly v taxonomickém složení bakteriálního společenstva na povrchu a uvnitř vejce. Je tedy nutno veškeré tyto studie a jejich výstupy interpretovat s velkou opatrností a brát zřetel na tento jejich potencionální nedostatek.

Za zmínku stojí také fakt, že studie nerozlišují subtropické a mírné podmínky prostředí a považují subtropický a mírný pás za biotop stejných charakteristik, i když existuje reálná možnost přechodného vlivu na intenzitu bakteriální zátěže mezi tropickým a mírným podnebným pásem.

8.2 Opomíjení významu mikroskopických hub

Studie poukazující na negativní vliv mikroorganismů na životaschopnost a líhnivost vajec jsou zaměřené v prvé řadě na bakterie. Už menší pozornost je však věnována přítomnosti mikroskopických hub v hnízdě a jejich vlivu na reprodukční parametry ptáků (viz. ale Cook *et al.* 2003; Godard *et al.* 2007; Goodenough & Stallwood 2010). Materiál, z kterého je hnízdo postaveno často poskytuje vhodné prostředí pro růst mikroskopických hub (Hubálek & Balát 1974). Například peří dospělců poskytuje vhodný substrát pro keratinolytické houby rodu *Arthroderma*, *Chrysosporium* a *Ctenomyces* (Pugh 1972). Podobně se ukazuje, že konstantní prostředí a mikroklimatické podmínky hnízdních budek poskytuje vhodné podmínky pro růst různých druhů mikroskopických hub (Otcenášek *et al.* 1967). Hnízdní budky poskytují také vhodné podmínky pro přezimování hub. Bylo prokázáno, že opakované hnízdění vrabce polního v hnízdní dutině, zvyšuje počet druhů mikroskopických hub nalezených v hnízdech. Například *Ctenomyces keratinophylum* a *Ctenomyces serratus* byly nalezeny v 7% hnízd umístěných v nově použitých hnízdních dutinách, zatímco u opakovaně použitých hnízdních dutin byly tyto druhy mikroskopických hub detekovány v 27% hnízd. Vliv na mykofloru hnízda měl také obsah vody v substrátu a celkové pH hnízda. Nejvyšší počet druhů mikroskopických hub bylo izolováno v hnízdech s pH v rozmezí 6,0-6,2. U vrabce polního byl počet druhů mikroskopických hub také nižší, pokud hnízdo obsahovalo vejce nebo mláďata. Tento efekt byl způsoben vyšší teplotou hnízda v přítomnosti vylíhlých mláďat (Hubálek *et al.* 1973).

To, že mikroskopické houby mohou ovlivňovat životaschopnost snůšky je však podceňováno. Board & Tranter (1986) ve své studii zjistili, že pravděpodobnost infekce byla vysoce závislá na přítomnosti mikroskopických hub na skořápce. Jejich přítomnost na skořápce může být nebezpečná, protože vejce má omezenou chemickou obranu proti houbám, které mohou zničit vaječnou kutikulu a usnadnit mikrobiální invazi radikálně zvětšeným množstvím otevřených pórů (Board 1966). Navíc růst houbových mycelií uvnitř vejce byl rychlý a rozsáhlý a často spojen se změnami konzistence bílku a perivitellinní membrány.

Godard *et al.* (2007) si všiml přítomnosti mikroskopických hub jak v otevřených, tak dutinových hnízdech, i když pravděpodobněji se nacházely na vejcích v hnízdech otevřených. Ale naopak poukazuje na to, že přítomnost nebo absence hub nehrála prediktivní roli v líhnivosti vajec. Na základě této studie tedy samotná přítomnost hub nevysvětlovala vysokou míru infekce vnitřních struktur vejce a snížené líhnivosti vajec.

Vzhledem k výše uvedeným studiím je zřejmé, že mikroskopickým houbám, jako nedílné součásti hnízdního společenstva, by měla být v budoucnu věnována větší pozornost s ohledem na jejich schopnosti usnadnit přechod mikroorganismů skrz skořápku i jejich možným patogenním vlastnostem.

9. Závěr

V této práci jsem na základě shrnutí veškerých dostupných studií týkajících se výskytu a původu mikroorganismů v hnízdním prostředí zjistila, že zdroje a výskyt mikroorganismů jsou bohaté a tvoří velmi diverzifikovanou skupinu. Mikroorganismy mohou silně kolonizovat nakladená vejce a za vhodných podmínek vstupovat do jejich vnitřních struktur, kde způsobují infekci. K infekci vaječného obsahu může dojít ale také v reprodukčních orgánech samice.

Riziko mikrobiální infekce vnitřních struktur vajec je podmíněno a ovlivněno vhodnými podmínkami prostředí. Ukazuje se, že zásadní roli v průniku bakterií do vejce hraje přítomnost vody na skořápce a fluktuace okolních teplot, které způsobují změny parciálních tlaků na povrchu skořápky a nasátí bakterií póry dovnitř vejce. Nicméně pravděpodobnost výskytu bakterií na skořápce, hlavního předpokladu infekce vaječného obsahu, je větší u dutinově hnízdících druhů ptáků a také v tropech, kde k poklesu životaschopnosti vajec vlivem mikrobiální infekce dochází rychleji než v mírném podnebném pásu.

Z negativních vlivů přítomnosti mikroorganismů na povrchu a uvnitř vejce je patrný především vliv na životaschopnost a líhivost vajec. Nicméně jednotlivé studie poukazují také na vliv mikroorganismů na vývoj a přežití embrya, růst a dokonce kognitivní schopnosti mláďat.

Za účelem snížení pravděpodobnosti mikrobiální infekce došlo u ptáků k vytvoření několika obranných mechanismů. Ukazuje se, že inkubace, určená k udržování vhodných podmínek pro vývoj embrya, hraje důležitou roli také v potlačení rizika mikrobiální infekce snůšky. Její efekt spočívá jak v eliminaci vody na povrchu skořápky, tak také v tom, že prostřednictvím inkubujících rodičů se na povrch skořápky mohou dostávat antimikrobiální sekrety uropygiální žlázy natírané do peří, které mohou usměrňovat nebo zcela eliminovat růst patogenního bakteriálního společenstva na povrchu skořápky. Také se zdá, že maternální depozice antimikrobiálních proteinů do bílku může zvýhodňovat časně nakladená vejce ptáků se synchronním líhnutím snůšek, kteří odkládají inkubaci do snesení posledního vejce snůšky. Dále se předpokládá, že také zabudovávání zelených rostlin do hnízda a pigmentace vajec mohly vzniknout jako obranné mechanismy před rizikem mikrobiální infekce snůšky.

Za významné evoluční důsledky týkající se reprodukčních strategií ptáků, které mohly vzniknout na základě selekčního tlaku ze strany mikroorganismů, můžeme považovat například modifikace v inkubačním chování, které vedou k asynchronnímu líhnutí mláďat, či redukci velikosti snůšky u většiny tropických druhů ptáků. Usuzuje se také, že

mikroorganismy mohou působit na evoluci pigmentace vajec u dutinových druhů ptáků či u druhů odkládajících inkubaci snůšky. Nicméně pro potvrzení těchto hypotéz je k dispozici stále velmi málo studií a jak bylo nastíněno v závěru práce, existuje řada problematických míst ve studiu, kterým by měla být věnovaná pozornost v budoucím výzkumu.

10. Přehled použité literatury

(*sekundární citace)

Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59, 143–169.

Arnold, T.W. (1993). Factors affecting egg viability and incubation time in prairie dabbling ducks. *Can. J. Zool.*, 71, 1146–1152.

Baggott, G.K. & Graeme-Cook, K. (2002). Microbiology of natural incubation. In: *Avian Incubation Behaviour, Environment, and Evolution* (ed. Deeming, D.C.). Oxford University Press, Oxford, pp. 638–646.

Bakken, G.S., Vanderbilt, V.C., Buttemer, W.A. & Dawson, W.R. (1978). Avian Eggs: Thermoregulatory Value of Very High Near-Infrared Reflectance. *Science*, 200, 321–323.

Bessinger, S.R. (1999). Interaction of egg viability, brood reduction and nest failure on the onset of incubation. In: *Proceedings of the 22nd International Ornithological Congress* (eds Adams, N. & Slotow, R.). BirdLife South Africa, Johannesburg, South Africa, pp. 638–646.

Beissinger, S.R., Cook, M.I. & Arendt, W.J. (2005). THE SHELF LIFE OF BIRD EGGS: TESTING EGG VIABILITY USING A TROPICAL CLIMATE GRADIENT. *Ecology*, 86, 2164–2175.

Berger, S., Disko, R. & Gwinner, H. (2003). Bacteria in starling nests. *J. Für Ornithol.*, 144, 317–322.

Board, R.G. (1966). The Course of Microbial Infection of the Hen's Egg. *J. Appl. Microbiol.*, 29, 319–341.

Board, R.G. & Fuller, R. (1994). *Microbiology of the Avian Egg*. Springer.

Board, R.G. & Halls, N.A. (1973). The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hens egg. *Br. Poult. Sci.*, 14, 69–97.

Board, R.G. & Tranter, H.S. (1986). The Microbiology of Eggs. In: *Egg Science and Technology*, 3rd edn. (eds Stadelman, W.J. & Cotterill, O.J.). AVI Publishing Co, Westport, pp. 75–96.

Board, R.G., Loseby, S. & Miles, V.R. (1979). A note on microbial growth on hen eggshells. *Br. Poult. Sci.*, 20, 413–420.

Bonisoli-Alquati, A., Rubolini, D., Romano, M., Cucco, M., Fasola, M., Caprioli, M., et al. (2010). Egg antimicrobials, embryo sex and chick phenotype in the yellow-legged gull. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64, 845–855.

Brittingham, M.C., Temple, S.A. & Duncan, R.M. (1988). A survey of the prevalence of selected bacteria in wild birds. *J. Wildl. Dis.*, 24, 299–307.

Bruce, J. & Drysdale, E.M. (1994). Trans-shell transmission. In: *Microbiology of the Avian Egg*. (eds Board, R.G. & Fuller, R.). Chapman and Hall, London, pp. 63–91.

Bruce, J. & Johnson, A.L. (1978). The bacterial flora of unhatched eggs. *Br. Poult. Sci.*, 19, 681–689.

- Cassey, P., Thomas, G.H., Portugal, S.J., Maurer, G., Hauber, M.E., Grim, T., et al. (2012).** Why are birds' eggs colourful? Eggshell pigments co-vary with life-history and nesting ecology among British breeding non-passerine birds. *Biol. J. Linn. Soc.*, 106, 657–672.
- Clark, L. & Mason, J. (1985).** Use of Nest Material as Insecticidal and Anti-Pathogenic Agents by the European Starling. *Oecologia*, 67, 169–176.
- Clark, L. & Mason, J.R. (1988).** Effect of Biologically Active Plants Used as Nest Material and the Derived Benefit to Starling Nestlings. *Oecologia*, 77, 174–180.
- Clark, A.B. & Wilson, D.S. (1981).** Avian breeding adaptations: hatching asynchrony, brood reduction, and nest failure. *Q. Rev. Biol.*, 56, 253–277.
- Clay, C.E. & Board, R.G. (1991).** Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens' shell eggs. *Epidemiol. Infect.*, 106, 271–281.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A. & Arendt, W.J. (2005a).** Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Ecol. Lett.*, 8, 532–537.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. & Arendt, W.J. (2003).** Trans-shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 270, 2233–2240.
- Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., Rodriguez, R.A. & Arendt, W.J. (2005b).** Microbial infection affects egg viability and incubation behavior in a tropical passerine. *Behav. Ecol.*, 16, 30–36.
- Cucco, M., Guasco, B., Ottonelli, R., Balbo, V. & Malacarne, G. (2009).** The influence of temperature on egg composition in the grey partridge *Perdix perdix*. *Ethol. Ecol. Evol.*, 21, 63–77.
- D'Alba, L., Oborn, A. & Shawkey, M.D. (2010).** Experimental evidence that keeping eggs dry is a mechanism for the antimicrobial effects of avian incubation. *Naturwissenschaften*, 97, 1089–1095.
- D'Alba, L., Shawkey, M.D., Korsten, P., Vedder, O., Kingma, S.A., Komdeur, j., et al. (2010).** Differential deposition of antimicrobial proteins in blue tit (*Cyanistes caeruleus*) clutches by laying order and male attractiveness. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 64, 1037–1045.
- Decuypere, E. & Michels, H. (1992).** Incubation temperature as a management tool: a review. *Worlds Poult. Sci. J.*, 48, 28–38.
- Fang, J., Ma, M., Jin, Y., Qiu, N., Huang, Q., Sun, s., et al. (2012b).** Liquefaction of albumen during the early incubational stages of the avian embryo and its impact on the antimicrobial activity of albumen. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 10, 423–427.
- Fang, J., Ma, M., Jin, Y., Qiu, N., Ren, G., Huang, X., et al. (2012a).** Changes in the antimicrobial potential of egg albumen during the early stages of incubation and its impact on the growth and virulence response of *Salmonella Enteritidis*. *Ital. J. Anim. Sci.*, 11.
- Fasenko, G.M., Robinson, F.E., Whelan, A.I., Kremeniuk, K.M. & Walker, J.A. (2001).** Prestorage incubation of long-term stored broiler breeder eggs: 1. Effects on hatchability. *Poult. Sci.*, 80, 1406–1411.
- Fonseca, B.B., Beletti, M.E., Melo, R.T., Mendonça, E.P., Vieira, C.U., Levenhagen, M.A., et al. (2011).** Transfer, viability and colonisation of *Campylobacter jejuni* in the chicken vitellus and in embryos. *Br. Poult. Sci.*, 52, 279–286.

- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T.J., et al. (2009).** Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *Fems Microbiol. Rev.*, 33, 718–738.
- Gill, F.B. (1995).** Nests and incubation. In: *Ornithology*, 2nd edn. (eds Gill, F.B.). WH Freeman and Co., New York
- Godard, R.D., Morgan Wilson, C., Frick, J.W., Siegel, P.B. & Bowers, B.B. (2007).** The effects of exposure and microbes on hatchability of eggs in open-cup and cavity nests. *J. Avian Biol.*, 38, 709–716.
- González-Braojos, S., Vela, A.I., Ruiz-de-Castañeda, R., Briones, V. & Moreno, J. (2011).** Age-related changes in abundance of enterococci and Enterobacteriaceae in Pied Flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings and their association with growth. *J. Ornithol.*, 153, 181–188.
- Goodenough, A.E. & Stallwood, B. (2010).** Intraspecific Variation and Interspecific Differences in the Bacterial and Fungal Assemblages of Blue Tit (*Cyanistes caeruleus*) and Great Tit (*Parus major*) Nests. *Microb. Ecol.*, 59, 221–232.
- Grande, J.M., Negro, J.J. & Torres, M.J. (2004).** The evolution of bird plumage colouration: a role for feather-degrading bacteria? *Ardeola Rev. Iber. Ornitol.*, 51, 375–383.
- Gunderson, A.R. (2008).** Feather-Degrading Bacteria: A New Frontier in Avian and Host-Parasite Research? *The Auk*, 125, 972–979.
- Gwinner, H. & Berger, S. (2005).** European starlings: nestling condition, parasites and green nest material during the breeding season. *J. Ornithol.*, 146, 365–371.
- Gwinner, H., Oltrogge, M., Trost, L. & Nienaber, U. (2000).** Green plants in starling nests: effects on nestlings. *Anim. Behav.*, 59, 301–309.
- Hansell, M.H. (2000).** *Bird Nests and Construction Behaviour*. Cambridge University Press.
- Hockey, P. a. R. (1982).** Adaptiveness of nest site selection and egg coloration in the African Black Oystercatcher *Haematopus moquini*. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 11, 117–123.
- Horrocks, N.P.C. (2012).** The role of disease risk and life history in the immune function of larks in different environments. The Netherlands. PhD thesis. University of Groningen. Centre for Ecological and Evolutionary Studies (CEES). Animal Ecology Group.
- Hubálek, Z. (1978).** Coincidence of Fungal Species Associated with Birds. *Ecology*, 59, 438–442.
- Hubálek, Z. & Balát, F. (1974).** The survival of microfungi in the nests of Tree-Sparrow [*Passer montanus* L.] in the nest-boxes over the winter season. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 54, 517–530.
- Hubálek, Z., Balát, F., Toušková, I. & Vlk, J. (1973).** Mycoflora of birds' nests in nest-boxes. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 49, 1–12.
- Chavez, C., Knape, K.D., Coufal, C.D. & Carey, J.B. (2002).** Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult. Sci.*, 81, 1132–1135.
- Ishikawa, S., Suzuki, K., Fukuda, E., Arihara, K., Yamamoto, Y., Mukai, T., et al. (2010).** Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. *Febs Lett.*, 584, 770–774.

- Javůrková, V., Albrecht, T., Mrázek, J. & Kreisinger, J. (2013).** Effect of parental behaviour on the probability of bacterial trans-shell infection: evaluating the role of intermittent incubation and clutch covering. *Ibis*, in press.
- Kennedy, G.Y. & Vevers, H.G. (1976).** A survey of avian eggshell pigments. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 55, 117–123.
- Lombardo, M.P. & Thorpe, P.A. (1999).** Microbial Colonization of the Cloacae of Nestling Tree Swallows. *The Auk*, 116, 947–956.
- Lombardo, M.P., Thorpe, P.A., Cichewicz, R., Henshaw, M., Millard, C., Steen, C., et al. (1996).** Communities of Cloacal Bacteria in Tree Swallow Families. *The Condor*, 98, 167–172.
- Martin-Platero, A.M., Valdivia, E., Ruiz-Rodriguez, M., Soler, J.J., Martin-Vivaldi, M., Maqueda, M., et al. (2006).** Characterization of Antimicrobial Substances Produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, Isolated from the Uropygial Gland of the Hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4245–4249.
- Martín-Vivaldi, M., Peña, A., Peralta-Sánchez, J.M., Sánchez, L., Ananou, S., Ruiz-Rodríguez, M., et al. (2010).** Antimicrobial chemicals in hoopoe preen secretions are produced by symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 277, 123–130.
- Maurer, G., Portugal, S.J. & Cassey, P. (2011).** Review: an embryo's eye view of avian eggshell pigmentation. *J. Avian Biol.*, 42, 494–504.
- McCabe, W.R. (1964).** Studies of Staphylococcal Infections. I. Virulence of Staphylococci and Characteristics of Infections in Embryonated Eggs *. *J. Clin. Invest.*, 43, 2146–2157.
- Mennerat, A., Mirleau, P., Blondel, J., Perret, P., Lambrechts, M.M. & Heeb, P. (2009).** Aromatic plants in nests of the blue tit *Cyanistes caeruleus* protect chicks from bacteria. *Oecologia*, 161, 849–855.
- Moller, A.P. (1984).** On the Use of Feathers in Birds' Nests: Predictions and Tests. *Ornis Scand.*, 15, 38.
- Moreno, J., Briones, V., Merino, S., Ballesteros, C., Sanz, J.J., Tomás, G., et al. (2003).** Beneficial Effects of Cloacal Bacteria on Growth and Fledging Size in Nestling Pied Flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in Spain. *Auk Am. Ornithol. Union*, 120, 784–790.
- *Norberg, U.M. (1990).** Vertebrate flight : mechanics, physiology, morphology, ecology and evolution / U. M. Norberg. *Serbiula Sist. Libr.* 20.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, 49–79.
- Otcenášek, M., Hudec, K., Hubálek, Z. & Dvorák, J. (1967).** Keratinophilic fungi from the nests of birds in Czechoslovakia. *Med. Mycol.*, 5, 350–354.
- Overington, S.E., Morand-Ferron, J., Boogert, N.J. & Lefebvre, L. (2009).** Technical innovations drive the relationship between innovativeness and residual brain size in birds. *Anim. Behav.*, 78, 1001–1010.
- Peralta-Sánchez, J.M., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A.M., Martínez-Bueno, M., Oñate, M., Ruiz-Rodríguez, M., et al. (2012).** Avian life history traits influence eggshell bacterial loads: a comparative analysis. *Ibis*, 154, 725–737.

Peralta-Sanchez, J.M., Møller, A.P., Martin-Platero, A.M. & Soler, J.J. (2010). Number and colour composition of nest lining feathers predict eggshell bacterial community in barn swallow nests: an experimental study. *Funct. Ecol.*, 24, 426–433.

Peralta-Sanchez, J.M., Møller, A.P. & Soler, J.J. (2011). Colour composition of nest lining feathers affects hatching success of barn swallows, *Hirundo rustica* (Passeriformes: Hirundinidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 102, 67–74.

Phelps, C.F. & Antonini, E. (1975). A study of the kinetics of iron and copper binding to hen ovotransferrin. *Biochem. J.*, 147, 385–391.

Pinowski, J., Barkowska, M., Kruszewicz, A.H. & Kruszewicz, A.G. (1994). The causes of the mortality of eggs and nestlings of *Passer* sp. *J. Biosci.*, 19, 441–451.

Pugh, G.J.F. (1972). The Contamination of Birds' Feathers by Fungi. *Ibis*, 114, 172–177.

Romanoff, A.L. (1943). Morphological and Physicochemical Differentiation in Various Layers of Avian Albumen. *J. Food Sci.*, 8, 286–291.

Ruiz-De-Castañeda, R., Vela, A.I., González-Braojos, S., Briones, V. & Moreno, J. (2011). Drying eggs to inhibit bacteria: Incubation during laying in a cavity nesting passerine. *Behav. Processes*, 88, 142–148.

Ruiz-de-castañeda, R., Vela, A.I., Lobato, E., Briones, V. & Moreno, J. (2012). Early Onset of Incubation and Eggshell Bacterial Loads in a Temperate-Zone Cavity-Nesting Passerine. *The Condor*, 114, 203–211.

Ruiz-de-Castañeda, R., Vela, A.I., Lobato, E., Briones, V. & Moreno, J. (2011). Bacterial Loads on Eggshells of the Pied Flycatcher: Environmental and Maternal Factors. *The Condor*, 113, 200–208.

Saino, N., Dall'ara, P., Martinelli, R. & Møller, A.P. (2002). Early maternal effects and antibacterial immune factors in the eggs, nestlings and adults of the barn swallow. *J. Evol. Biol.*, 15, 735–743.

Saino, N., Romano, M., Ambrosini, R., Ferrari, R.P. & Møller, A.P. (2004). Timing of reproduction and egg quality covary with temperature in the insectivorous Barn Swallow, *Hirundo rustica*. *Funct. Ecol.*, 18, 50–57.

Salton, M.R.J. (1957). THE PROPERTIES OF LYSOZYME AND ITS ACTION ON MICROORGANISMS. *Bacteriol. Rev.*, 21, 82–100.

Scott, T.A. (1993). The Effect of UV-Light and Air Filtering System on Embryo Viability and Microorganism Load on the Egg Shell. *J. Appl. Poult. Res.*, 2, 19–25.

Sengupta & Sengupta, S. (1981). ADAPTIVE SIGNIFICANCE OF THE USE OF MARGOSA LEAVES IN NESTS OF HOUSE SPARROWS *PASSER-DOMESTICUS*. *EMU*, 81, 114–115.

Shafey, T.M., Al-Batshan, H.A., Ghannam, M.M. & Al-Ayed, M.S. (2005). Effect of intensity of eggshell pigment and illuminated incubation on hatchability of brown eggs. *Br. Poult. Sci.*, 46, 190–198.

Shawkey, M.D., Firestone, M.K., Brodie, E.L. & Beissinger, S.R. (2009). Avian Incubation Inhibits Growth and Diversification of Bacterial Assemblages on Eggs. *Plos One*, 4.

- Shawkey, M.D., Kosciuch, K.L., Liu, M., Rohwer, F.C., Loos, E.R., Wang, J.M., et al. (2008).** Do birds differentially distribute antimicrobial proteins within clutches of eggs? *Behav. Ecol.*, 19, 920–927.
- Shawkey, M.D., Pillai, S.R. & Hill, G.E. (2003).** Chemical warfare? Effects of uropygial oil on feather-degrading bacteria. *J. Avian Biol.*, 34, 345–349.
- Skutch, A.F. (1985).** *Clutch size, nesting success, and predation on nests of neotropical birds, reviewed.* Washington, D.C, American Ornithologists Union, US.
- Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Peralta-Sánchez, J.M., Ruiz-Rodríguez, M. (2010).** Antibiotic-producing bacteria as a possible defence of birds against pathogenic microorganisms. *Open Ornithology Journal*, 3, 93–100.
- Soler, J.J., Martín-Vivaldi, M., Ruiz-Rodríguez, M., Valdivia, E., Martín-Platero, A.M., Martínez-Bueno, M., et al. (2008).** Symbiotic association between hoopoes and antibiotic-producing bacteria that live in their uropygial gland. *Funct. Ecol.*, 22, 864–871.
- Soler, J.J., Peralta-Sánchez, J.M., Flensted-Jensen, E., Martín-Platero, A.M. & Møller, A.P. (2011a).** Innate humoral immunity is related to eggshell bacterial load of European birds: a comparative analysis. *Naturwissenschaften*, 98, 807–813.
- Soler, J.J., Peralta-Sánchez, J.M., Martínez-Bueno, M., Martín-Vivaldi, M., Martín-Gálvez, D., Vela, A.I., et al. (2011b).** Brood parasitism is associated with increased bacterial contamination of host eggs: bacterial loads of host and parasitic eggs. *Biol. J. Linn. Soc.*, 103, 836–848.
- Soler, J.J., Peralta-Sánchez, J.M., Martín-Platero, A.M., Martín-Vivaldi, M., Martínez-Bueno, M. & Møller, A.P. (2012a).** The evolution of size of the uropygial gland: mutualistic feather mites and uropygial secretion reduce bacterial loads of eggshells and hatching failures of European birds. *J. Evol. Biol.*, 25, 1779–1791.
- Soler, J.J., Peralta-Sánchez, J.M., Martín-Vivaldi, M., Martín-Platero, A.M., Flensted-Jensen, E. & Møller, A.P. (2012b).** Cognitive skills and bacterial load: comparative evidence of costs of cognitive proficiency in birds. *Naturwissenschaften*, 99, 111–122.
- Sparks, N.H.C. & Board, R.G. (1985).** Bacterial penetration of the recently oviposited shell of hens' eggs. *Aust. Vet. J.*, 62, 169–170.
- Stadelman, W.J. & Cotterill, O.J. (1995).** *Egg Science and Technology.* Routledge.
- Stewart, R. & Rambo, T.B. (2000).** Cloacal microbes in house sparrows. *The Condor*, 102, 679–684.
- Stoleson, S.H. & Beissinger, S.R. (1999).** Egg viability as a constraint on hatching synchrony at high ambient temperatures. *J. Anim. Ecol.*, 68, 951–962.
- Theron, H., Venter, P. & Lues, J.F.. (2003).** Bacterial growth on chicken eggs in various storage environments. *Food Res. Int.*, 36, 969–975.
- Veiga, J.P. & Veiga. (1992).** Hatching asynchrony in the house sparrow - a test of the egg-viability hypothesis. *Am. Nat.*, 139, 669–675.
- Verbeek, N. a. M. (1988).** Differential predation of eggs in clutches of Glaucous-winged Gulls *Larus glaucescens*. *Ibis*, 130, 512–518.

- Veterány, L., Hluchý, S. & Veterányová, A. (2004).** The influence of ultra-violet radiation on chicken hatching. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 39, 2333–2339.
- Walls, J.G., Hepp, G.R. & Eckhardt, L.G. (2012).** Effects of Nest Reuse and Onset of Incubation on Microbial Growth and Viability of Wood Duck Eggs. *The Condor*, 114, 720–725.
- Wang, J.M. & Beissinger, S.R. (2011).** Partial Incubation in Birds: Its Occurrence, Function, and Quantification. *The Auk*, 128, 454–466.
- Wang, J.M., Firestone, M.K. & Beissinger, S.R. (2011).** Microbial and environmental effects on avian egg viability: Do tropical mechanisms act in a temperate environment? *Ecology*, 92, 1137–1145.
- Webb, D. (1987).** Thermal Tolerance of Avian Embryos - a Review. *Condor*, 89, 874–898.
- Weidinger, K. (2001).** Does egg colour affect predation rate on open passerine nests? *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 49, 456–464.
- Wellman-Labadie, O., Picman, J. & Hincke, M.T. (2008).** Comparative antibacterial activity of avian egg white protein extracts. *Br. Poult. Sci.*, 49, 125–132.
- Wellman-Labadie, O., Picman, J. & Hincke, M.T. (2007).** Avian antimicrobial proteins: structure, distribution and activity. *Worlds Poult. Sci. J.*, 63, 421–438.
- Wimberger, P.H. (1984).** The use of green plant material in bird nests to avoid ectoparasites. *The Auk*, 101, 615.
- Wiebe, K. L., Koenig, W. D. & Martin, K. (2007).** Costs and benefits of nest reuse versus excavation in cavity-nesting birds. *Annales Zoologici Fennici*, 44, 209–217.
- *Zagaevsky, J.S. & Lutikova, P.O. (1944).** Sanitary measures in the egg breaking plant. *Egg Poult. Mag.*, 50, 17.

11. Přílohy

Tab. 1. Shrnutí efektu mikroorganismů na vejce nebo konkrétní fenotypovou charakteristiku mláďete ve studiích prováděných v přirozených podmínkách prostředí. Symboly: „0“ efekt nebyl ve studii prokázán, „-“ prokázán negativní efekt na daný fenotyp. Seznam studií: a) Berger *et al.* 2003, b) Cook *et al.* 2003, c) Cook *et al.* 2005b, d) Ruiz-de-Castañeda *et al.* 2011, e) Wang *et al.* 2011, f) Godard *et al.* 2007, g) Javůrková *et al.* 2013 in press, h) Pinowski *et al.* 1994, ch) Soler *et al.* 2012.

Fenotyp	Efekt	Analyzovaná část	Biotop	Studovaný druh	Seznam studií
líhnivost	0	hnízdo	mírný pás	<i>Sturnus vulgaris</i>	a
	-	žloutek	tropický pás	<i>Gallus gallus domesticus</i>	b
	-	bílek			b
	-	perivitelinová membrána			b
	-	skořápka			b
	-	žloutek	tropický pás	<i>Margarops fuscatus</i>	c
	-	bílek			c
	-	skořápka			c
	0	skořápka	mírný pás	<i>Ficedula hypoleuca</i>	d
	0	žloutek	mírný pás	<i>Sialia mexicana</i>	e
	0	bílek		<i>Tachycineta bicolor</i>	e
	0	skořápka		<i>Tachycineta thalassina</i>	e
	- v otevřených hnízdech	skořápka	mírný pás	<i>Gallus gallus domesticus</i>	f
	0	bílek	mírný pás	<i>Anas platyrhynchos</i>	g
mortalita embrya	-	hnízdo	mírný pás	<i>Passer domesticus</i> , <i>Passer montanus</i>	h
hmotnost mláďete	-	bílek	mírný pás	<i>Anas platyrhynchos</i>	g
kognitivní schopnosti	-	skořápka	mírný pás	58 druhů ptáků	ch

Tab. 2. Adaptivní modifikace ukládání antimikrobiálních proteinů v bílku samicemi v závislosti na pořadí kladení, zvýšené okolní humiditě prostředí a okolní teplotě. Symboly: „0“ koncentrace konkrétního proteinů klesá nebo se nemění v závislosti na daném kritériu, „+“ koncentrace proteinu se zvyšuje s daným kritériem. Seznam studií: a) Saino *et al.* 2002, b) D’Alba *et al.* 2010, c) Bonisoli-Alquati *et al.* 2010, d) Shawkey *et al.* 2008, e) Horrocks *et al.* 2011, f) Saino *et al.* 2004, g) Cucco *et al.* 2009.

Ukládání proteinu do vejce v závislost na:	Antimikrobiální protein	Efekt	Biotop	Studovaný druh	Seznam studií
pořadí kladení	lysozym	+	mírný pás	<i>Hirudo rustica</i>	a
		0	mírný pás	<i>Cyanistes caeruleus</i>	b
		+	mírný pás	<i>Larus michahellis</i>	c
	ovotransferrin	0	tropický pás	<i>Margarops fuscatus</i>	d
		0	mírný pás	<i>Tachycineta thalassina</i>	d
		0	mírný pás	<i>Cyanistes caeruleus</i>	b
	avidin	+	mírný pás	<i>Tachycineta thalassina</i>	d
		+	mírný pás	<i>Tachycineta bicolor</i>	d
		0	mírný pás	<i>Cyanistes caeruleus</i>	b
		0	mírný pás	<i>Larus michahellis</i>	c
zvýšené humiditě prostředí	lysozym	0	podél humidního gradientu	<i>Alaudidae</i>	e
	ovotransferrin	+	podél humidního gradientu	<i>Alaudidae</i>	e
okolní teplotě	lysozym	+	podél humidního gradientu	<i>Alaudidae</i>	e
		+	mírný pás	<i>Hirudo rustica</i>	f
		0	mírný pás	<i>Perdix perdix</i>	g
	ovotransferrin	0	podél humidního gradientu	<i>Alaudidae</i>	e
		+	mírný pás	<i>Perdix perdix</i>	g

Tab. 3. Shrnutí obranných mechanismů, které byly testovány na potlačení mikrobiální infekce na povrchu vejce a jejich prokázané efekty. Symboly: „+“ docházelo k redukci bakterií na povrchu vejce, „-“ efekt nebyl prokázán. Seznam studií: a) Cook *et al.* 2005a, b) Shawkey *et al.* 2009, c) D’Alba *et al.* 2010, d) Ruiz-De-Castañeda *et al.* 2011, e) Ruiz-de-castañeda *et al.* 2012, f) Walls *et al.* 2012, g) Soler *et al.* 2008, f) Soler *et al.* 2012, ch) Gwinner & Berger 2005, i) Mennerat *et al.* 2009, j) Clark & Mason 1985, k) Scott 1993, l) Chavez *et al.* 2002, m) Ishikawa *et al.* 2010, n) Soler *et al.* 2011, o) Peralta-Sanchez *et al.* 2011.

Obranný mechanismus	Efekt	Analyzovaná část	Studovaný druh	Biotop	Studie
inkubace	+	skořápka	<i>Margarops fuscatus</i>	tropický pás	a
	+	skořápka	<i>Margarops fuscatus</i>	tropický pás	b
	+	skořápka	<i>Tachycineta bicolor</i>	mírný pás	c
	+	skořápka	<i>Ficedula hypoleuca</i>	mírný pás	d
	+	skořápka	<i>Ficedula hypoleuca</i>	mírný pás	e
	+	skořápka	<i>Aix sponsa</i>	mírný pás	f
	+	skořápka	<i>Upupa epops</i>	mírný pás	g
sekrety uropygiální žlázy					
roztoči v peří	+	skořápka	<i>Upupa epops</i>	mírný pás	h
zelené rostliny	+	mláďata	<i>Sturnus vulgaris</i>	mírný pás	ch
	+	mláďata	<i>Cyanistes caeruleus</i>	mírný pás	i
	+	hnízdo	<i>Sturnus vulgaris</i>	mírný pás	j
UV světlo	+	skořápka	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>in vitro</i> testování	k
	+	skořápka	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>in vitro</i> testování	l
pigmentace vaječné skořápky	+ na gram-positivní	skořápka	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>in vitro</i> testování	m
	- na gram-negativní	skořápka	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>in vitro</i> testování	m
imunitní systém rodičů	+	skořápka	35 druhů ptáků	mírný pás	n
bílé peří v hnízdě	+	skořápka	<i>Hirudo rustica</i>	mírný pás	o